

PORTADA

*Dinámica poblacional
del virus de
la coriomeningitis
linfocitaria de ratón en
su interacción con
agentes mutagénicos*

Doctorando:

Héctor Moreno Borrego

Directores:

Esteban Domingo Solans

Verónica Martín García

A mi Madre.
A mi Padre y a mi Hermana.

AGRADECIMIENTOS:

En primer lugar, me gustaría agradecer al Profesor Esteban Domingo Solans la oportunidad brindada de realizar esta tesis doctoral en su laboratorio y de instruirme en el campo de la investigación y la Ciencia.

Querría dar mi más sincero agradecimiento a la Doctora Verónica Martín, quien ha estado ahí a las duras y a las maduras, que ha sido la mejor, y cuya sinceridad, claridad y criterio científico son para mi un modelo a seguir.

A Alberto Rastrojo y a René Toribio, con los que ha sido casi imposible aburrirse en el CBM y gracias a los cuales tener un sólo punto de vista si que ha sido imposible. A Paquito Hernández-Torres y Eloy Hernández, por ser los mayores del grupo e ir por delante. Sois unos cracks!

Al doctor Juan Carlos de la Torre, Beatrice Cubitt y a Nhi Ngo, por darme tan excelente acogida durante mi estancia en San Diego. A Ángela Vazquez, que se vino al Scripps a disfrutar del buen tiempo y la buena Ciencia!

A Teresa Rodriguez, que pasó del "yo no quiero ser *freaky*" a irse a San Diego, donde si no eres *freaky* no eres nah! Quien te ha visto y quien te ve!!!

A Natalia-la-mujer-de-pelo-de-fuego, sin la que al mundo le faltaría una aventurera (y una científica!); A Pablo Morales que aunque debe escalar muy bien, nunca le he visto hacerlo!

A Nacho de la Higuera y Elena Moreno, que comparten el *Lado Oscuro de la Fuerza*.

A Alfonso, siempre preparado.

A Virginia Pelayo, que era científica y no lo sabía!

A Ana de Ávila e Isabel Gallego, porque sin su *technical support* y ayuda, hacer todo esto habría sido una locura (más), y a todo el personal del laboratorio, que han sido compañeros de viaje de estos años y que han hecho un ambiente de laboratorio irrepetible!

A todos esos personajes y personitas que me han soportado y me han aportado más y más puntos de vista, que me han animado cuando yo lo mandaba todo por el retrete, que han compartido mis logros, dentro y fuera del Laboratorio, y que me han recordado quien era, quien soy y que hay que luchar por lo que se quiere ser.

A todos, del primero al último: **GRACIAS!!!!**

Abreviaturas, términos y acrónimos.

Se han incluido, en la presente tesis doctoral, los siguientes abreviaturas, términos y acrónimos que o bien se utilizan indistintamente en inglés o español, o bien no poseen una traducción al castellano universalmente aceptada.

A	Adenina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ARNr	ARN ribosómico
ARNt	ARN transferente
BHK-21	Riñón de hámster cachorro.
C	Citosina
CAP	7-Metilguanosina en el extremo 5' del ARNm
CAT	Cloranfenicol acetil-transferasa
DAAs	Agentes antivirales directos (direct acting antiviral agents)
DMEM	Medio de Eagle modificado por Dulbecco
dUMP	Desoxiuridina monofosfato
dTMP	Desoxitimidina trifosfato
EC	Efecto citopático
EMCV	Virus de la encefalomiocarditis de ratón (Encephalomyocarditis Virus)
<i>Exo3'-5'</i>	Exonucleasa 3'-5'
FdUDP	5-fluorodesoxiruidina-5'-difosfato
FdUMP	5-fluorodesoxiuridina-5'-monofosfato
FdUTP	5-fluorodesoxiruidina-5'-trifosfato
Fitness	Eficacia biológica
FU	5-fluorouracilo
FUMP	5-fluorouridina-5'-monofosfato
FUTP	5-fluorouridina-5'-trifosfato
G	Guanosina
GDI	Genomas defectivos interferentes
GFP	Proteína verde fluorescente (green fluorescent protein)
HCV	Virus de la hepatitis C (Hepatitis C virus)
HIV-1	Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (Human immunodeficiency virus type 1)
hpi	Horas post infección
IGR	Región intergénica (intergenic region)

IFN	Interferón
IFNp	Interferón pegilado
<i>IMPDH</i>	Inosín monofosfato deshidrogenasa
IL	Interleucina
LCMV	Virus de la coriomeningitis linfocitaria de ratón (Lymphocytic choriomeningitis virus)
LSV	Virus de Lassa (Lassa virus)
MdI	Multiplicidad de infección
PBS	Solución salina tamponada fosfato (Phosphate buffered solution)
PV	Poliovirus
RFP	Proteína roja fluorescente (Red fluorescent protein)
Rib	Ribavirin
RMP	Ribavirina-5'-monofosfato
RTP	Ribavirina-5'-trifosfato
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
Sn	Entropía de Shannon normalizada
SSP	Péptido pequeño señal (Small signal peptide)
SFB	Suero fetal bovino
T	Timina
Tailing	Reacción de incorporación de adenosina en el extremo ADN mediante Taq polimerasa
<i>TS</i>	Timidilato sintasa
TMV	Virus del mosaico del tabaco (Tobacco mosaic virus)
U	Uracilo
UFP	Unidades formadoras de placa
UTR	Región no traducida (Untranslated region)
VSV	Virus de la estomatitis vesicular (Vesicular stomatitis virus)

ÍNDICE

“Si un hombre no tiene sus conocimientos en orden, cuantos más posea mayor será su confusión.”

*Herbert Spencer (1820-1903)
Sociólogo, filósofo y psicólogo social*

1. Resumen / Summary.....	19
2. Introducción.....	23
2.1. Virus ARN	23
2.2. Variabilidad genética en las poblaciones de virus ARN	23
2.2.1. Frecuencias de mutación, recombinación y reordenamien- tos génicos en virus ARN	23
2.2.2. Cuasiespecies como concepto de unidad selectiva	25
2.2.3. Implicaciones biológicas de la dinámica de cuasiespecies	27
2.3. Catástrofe de error y mutagénesis letal como estrategia antivi- ral	28
2.3.1. Catástrofe de error y mutagénesis letal	28
2.3.2. Modelo de defección letal	30
2.4. El virus de la coriomeningitis linfocitaria de ratón (LCMV) como modelo de estudio de cuasiespecies virales y entrada en ca- tástrofe de error	30
2.4.1. LCMV y la familia Arenaviridae	30
2.4.2. Estructura molecular y genómica de la partícula infeccio- sa de LCMV	31
2.5. Drogas con efectos antivirales para LCMV	34
2.5.1. 5-Fluorouracilo	34
2.5.1.1. Estructura y metabolismo del 5-fluorouracilo	34
2.5.1.2. Efecto del 5-fluorouracilo en LCMV	35
2.5.2. Ribavirina	39
2.5.2.1. Estructura y metabolismo de la ribavirina	39

ÍNDICE

2.5.2.2. Uso de la ribavirina en tratamientos antivirales	40
2.5.2.3. Mecanismos antivirales propuestos para la ribavirina en virus ARN	44
2.5.2.4. Efecto de la ribavirina en LCMV	47
3. Objetivos.....	49
4. Materiales y Métodos.....	51
4.1. Cultivo de células eucariotas	51
4.2. Virus utilizados	51
4.2.1. LCMV	51
4.2.2. Otros virus	52
4.3. Drogas empleadas	52
4.4. Infecciones virales	53
4.4.1. Infecciones virales de células BHK-21, BHK-21 _{NP} ó A549 en medio líquido	53
4.4.2. Infecciones de LCMV en medio semisólido en células Vero	53
4.4.3. Infecciones de LCMV en medio líquido en células Vero	54
4.4.4. Infecciones de FMDV, EMCV y VSV en medio semisólido en células BHK-21	55
4.5. Extracción de ARN viral	55
4.6. Obtención de ADNc	56
4.7. Amplificación del ADNc viral	56
4.8. Mutagénesis dirigida por PCR	57
4.9. Purificación de fragmentos de ADN amplificados por PCR	59
4.10. Secuenciación de ADN	60
4.11. Cuantificación de moléculas de ARN viral por amplificación mediante PCR en tiempo real	60

4.12. Clonaje molecular para el análisis genético de poblaciones de LCMV, EMCV, VSV y FMDV	61
4.12.1. Clonaje en pGEM-T Easy	61
4.12.2. Clonaje en pCR2.1	61
4.12.3. Clonaje en pCAGGS ó pC-pol1	62
4.13. Transformación y purificación de ADN	62
4.14. Transfección de plásmidos	64
4.14.1. Transfección en células A549 y ensayo de <i>minigenoma</i>	64
4.14.2. Transfección en células BHK-21, BHK-21 _{NP} y ensayo de recuperación de virus	65
4.15. Cálculo de la entropía de Shannon normalizada y frecuencias de mutación máxima, mínima y específica	66
4.16. Disoluciones utilizadas	67
5. Resultados.....	69
5.1. Cinéticas de crecimiento de LCMV a distintas multiplicidades de infección (MdI)	69
5.2. Cuantificación del ARN intracelular de los segmentos genómicos L y S en infecciones de LCMV a MdI de 0.01 y 10 UFP/cél	70
5.3. Efecto del 5-fluorouracilo en distintos virus a distintas MdI	71
5.3.1. Efecto del 5-fluorouracilo sobre el título de LCMV a distintas MdI	71
5.3.2. Titulación, cuantificación de ARN viral e infectividad específica de LCMV en ausencia y presencia de 5-fluorouracilo, a diferentes tiempos y MdI	73
5.3.3. Análisis genético de las poblaciones de LCMV a baja y alta MdI en ausencia y presencia de 5-fluorouracilo	75
5.3.4. Efecto del 5-fluorouracilo en infecciones con EMCV, VSV y FMDV a distintas MdI	78

5.3.5. Influencia de la mutagénesis previa en EMCV sobre el efecto del 5-fluorouracilo a baja y alta MdI	80
5.3.6. Análisis genético de las poblaciones de EMCV, VSV y FMDV a baja y alta MdI en ausencia y presencia de 5-fluorouracilo	80
5.4. Exclusión de reinfección por LCMV en células BHK-21	83
5.5. Efecto antiviral de la ribavirina sobre poblaciones de LCMV	87
5.5.1. Efecto de la concentración de ribavirina sobre el título viral, la cantidad de ARN viral y la infectividad específica de LCMV	87
5.5.2. Efecto de la eliminación de ribavirina en el segundo pase	90
5.5.3. Efecto de la guanosina en la inhibición ejercida por la ribavirina sobre el título de LCMV en un sólo pase	91
5.5.4. Análisis genético de poblaciones de LCMV tratadas con ribavirina y guanosina	93
5.5.5. Efecto del ácido micofenólico en LCMV	95
5.5.6. Efecto de la ribavirina en pases de LCMV en células BHK-21	98
5.6. Administración de ribavirina y 5-fluorouracilo en LCMV de manera combinada y secuencial	102
5.6.1. Efecto de ribavirina y 5-fluorouracilo sobre LCMV con distintos protocolos de administración	102
5.6.2. Efecto de la concentración de ribavirina en la administración combinada y secuencial	104
5.6.3. Análisis genético de las poblaciones de LCMV tras la administración de ribavirina y 5-fluorouracilo de manera combinada y secuencial	107
5.7. Caracterización biológica de mutantes en el dominio exonucleasa 3'-5' de la nucleoproteína de LCMV	110
5.7.1. Pases seriados del mutante D382A en células BHK-21	111

5.7.2. Complementación en <i>trans</i> del título viral y de la cantidad de ARN viral del mutante D382A en células BHK-21 _{NP}	113
5.7.3. Producción de progenie infecciosa del mutante D382A en distintos tipos celulares	114
5.7.4. Análisis genético del espectro de mutantes las poblaciones derivadas del mutante D382A	114
6. Discusión.....	119
6.1. La baja carga viral favorece el efecto de la mutagénesis incrementada	119
6.2. La ribavirina presenta un efecto dual como mutágeno e inhibidor de la replicación de LCMV	121
6.3. Efecto antiviral sinérgico entre ribavirina y 5-fluorouracilo en la administración secuencial en LCMV	125
6.4. El dominio DH-D-D de la nucleoproteína de LCMV es importante para la viabilidad de LCMV	128
7. Conclusiones / Conclusions.....	131
8. Bibliografía.....	135
9. Anexo.....	153

RESUMEN / SUMMARY

“Se debe hacer todo tan sencillo como sea posible, pero no más sencillo”

Albert Einstein (1879-1955)

Físico alemán

RNA virus populations are defined as complex distributions of different but closely related genomes, termed quasispecies. The properties of the population and behavior in response to environmental changes, such as immune response or drug treatments, are partly influenced by interaction among genomes. Such interactions can be either positive (complementation) or negative (interference). The heterogeneity in a quasispecies is due to the low template-copying fidelity during RNA replication and lack of proofreading-repair activities in viral polymerases. In consequence, a quasispecies replicates close to an error threshold, beyond which the information can not be maintained, driving the viral population towards extinction. The transition beyond the error threshold is termed error catastrophe.

Ribavirin (Rib) is a wide-spectrum antiviral drug, used in hepatitis C virus infections and against hemorrhagic fever viruses, but the mechanism of action remains unknown for several viruses. 5-Fluorouracil (FU) is a classic mutagen for several viruses. The main objective of this Ph. D. Thesis is to elucidate the mechanism of action of Rib on LCMV and the design of antiviral treatments based upon the sequential administration of Rib and FU. Depending on the virus, Rib exerts its antiviral activity as a replication inhibitor and/or as a mutagen. The results presented in this Ph. D. Thesis indicate that the behavior of LCMV populations against Rib treatments in cell culture varies as a function of the drug concentration used. At low Rib concentrations, the mutation frequency and normalized Shannon entropy increase, resulting in a higher mutant spectrum complexity. At high Rib concentrations, the mutant spectrum complexity is similar to that observed in absence of Rib, and RNA synthesis is inhibited. The inhibition of viral RNA synthesis, but not

the increase in mutation rates exerted by Rib, is reverted by the presence of guanosine during the infection. Based on quasispecies theory and the lethal defection model, combined and sequential treatments were designed, using Rib and FU, in order to produce a deeper antiviral effect. No differences in progeny production or RNA synthesis were observed between mutagenic (20 μ M) or inhibitory concentrations (60 μ M) of Rib, when used in combination with FU (Rib+FU). In contrast, in sequential treatments (Rib \rightarrow FU), the largest decrease in virus production was observed when inhibitory concentrations of Rib were used, prior to FU administration. These results are consistent with theoretical models that predict an advantage of a sequential inhibitor-mutagen administration over the corresponding combination treatment within some range of parameters (replicative and of intensity of inhibition and mutagenesis). Thus, the clarification of the mechanism of Rib action may be essential for the design of effective antiviral treatments.

“La ciencia avanza a pasos, no a saltos”

Thomas Macaulay (1800-1859)
Historiador y político británico

2. Introducción

2.1. Virus ARN

Los virus son entidades biológicas carentes de metabolismo propio y que, por tanto, requieren de un hospedador celular para su replicación. Para que un virus complete su ciclo infeccioso es necesario que pueda desempeñar las funciones de reconocimiento de células susceptibles (Baranowski, E. *et al.*, 2001), entrada en la célula (Levy, H. *et al.*, 2010) y empleo de la maquinaria celular para replicar su material genético y producir progenie viral infecciosa (Kash, J. C. *et al.*, 2006; Henry, M. *et al.*, 2009). El carácter citopático o persistente de las infecciones depende tanto del virus como de la célula infectada (Domingo, E., 1998; Buenz, E. J. *et al.*, 2006; Kirzinger, M. W. *et al.*, 2012) y en los sistemas in vivo depende también, del estado del animal (Lamontagne, L. M. *et al.*, 1984; Kirzinger, M. W. *et al.*, 2012). Asimismo, la infección viral puede desencadenar diferentes efectos o síntomas dependiendo del tipo celular u organismo infectado. Los virus ARN constituyen más del 70% de los virus patógenos que infectan organismos superiores, y son responsables de gran cantidad de enfermedades de relevancia biomédica (SIDA, hepatitis víricas, poliomielitis, enfermedades hemorrágicas, etcétera) y agroalimentaria (fiebre aftosa, la lengua azul, etcétera).

2.2. Variabilidad genética en las poblaciones de virus ARN

2.2.1. Frecuencias de mutación, recombinación y reordenamientos génicos en virus ARN

Las poblaciones de virus ARN exhiben una elevada variabilidad y

INTRODUCCIÓN

heterogeneidad genética lo que les confiere una gran capacidad adaptativa (Mikkelsen, J. G. *et al.*, 2000; Domingo, E., 2007). La elevada variabilidad genética característica de las poblaciones de virus ARN es debida a varios factores:

- *Altas tasas de error durante la replicación viral.* Las frecuencias de mutación determinadas para virus ARN se han estimado en 10^{-3} a 10^{-5} errores por nucleótido copiado (Batschelet, E. *et al.*, 1976; Drake, J. W., 1991; Domingo, E., 2007). Esto representa valores muy superiores a los observados en organismos cuyo material genético es ADN (de 10^{-8} a 10^{-11} errores por nucleótido copiado) (Kunkel, T. A. *et al.*, 1986; Drake, J. W., 1991; Echols, H. *et al.*, 1991). Entre los virus ARN, y a excepción de los virus del género Coronavirus (Bernad, A. *et al.*, 1989a; Eckerle, L. D. *et al.*, 2007; Eckerle, L. D. *et al.*, 2010; Denison, M. R. *et al.*, 2011) no existen descritos dominios exonucleasa 3'-5' (*Exo3'-5'*) con actividad correctora de errores. La ausencia de dicha actividad, presente en todos los organismos superiores (Bernad, A. *et al.*, 1989) contribuye a la mayor frecuencia de mutación observada en poblaciones de virus ARN.

- *Recombinación.* La recombinación, tanto homóloga como no homóloga (Mikkelsen, J. G. *et al.*, 2000; Gallei, A. *et al.*, 2004; Agol, V. I., 2006) en virus ARN (especialmente frecuente en virus de polaridad positiva) añade variabilidad a las poblaciones virales.

- *Reordenamientos génicos.* Los reordenamientos génicos en virus segmentados de ARN permiten grandes cambios genotípicos y fenotípicos (Greenbaum, B. D. *et al.*, 2012). Los reordenamientos génicos en el virus de la gripe son a menudo el origen de pandemias (Webster, R. G., 1999).

- *Mecanismos de reparación celulares.* Los mecanismos celulares de reparación postreplicativa actúan sobre ADN bicatenario, pero no sobre ARN bicatenario o híbridos de ADN:ARN, por lo que nucleótidos incorporados

erróneamente en los virus ARN no pueden ser reparados mediante de dichas actividades (Schaaper, R. M., 1993; Friedberg, E. C. *et al.*, 2006).

2.2.2. Cuasiespecies como concepto de unidades selectivas

La elevada tasa de error, los cortos tiempos de replicación y el elevado tamaño poblacional de las poblaciones de virus ARN dan lugar a la generación de un abanico de genomas, muchos de los cuales no son viables o poseen una eficacia biológica muy inferior a la del virus silvestre (Domingo, E. *et al.*, 1996; Domingo, E. *et al.*, 1997a). En esta situación, la generación de nuevos genomas puede ser superior o equivalente a la desaparición de genomas, por lo que la población puede alcanzar un equilibrio en el que coexisten múltiples genomas variantes (Manrubia, S. C. *et al.*, 2005). Esta estructura poblacional recibe el nombre de cuasiespecies (Domingo, E. *et al.*, 1978; Holland, J. J. *et al.*, 1982; Nowak, M. A., 1992; Eigen, M., 1993; Manrubia, S. C. *et al.*, 2005; Domingo, E., 2006; Domingo, E. *et al.*, 2006; Domingo, E., 2007).

Cuasiespecies es un conjunto de genomas no idénticos, estrechamente relacionados entre sí, denominado espectro, enjambre o nube de mutantes, sometido a variación genética, competición y selección génica (Figura 2.1). El concepto teórico fue acuñado inicialmente por Eigen y Schuster como un modelo de evolución molecular para describir la estructura poblacional y adaptabilidad de replicones primitivos (Eigen, M., 1971; Eigen, M. *et al.*, 1979; Eigen, M. *et al.*, 1988a; Eigen, M. *et al.*, 1988b; Biebricher, C. K. *et al.*, 2006a; Biebricher, C. K. *et al.*, 2006b). El fago Q β , el virus de la fiebre aftosa (FMDV) y el virus de la estomatitis vesicular (VSV) sirvieron como modelos iniciales para demostrar la organización poblacional en cuasiespecies (Domingo, E. *et al.*, 1978; Domingo, E. *et al.*, 1980; Holland, J. J. *et al.*, 1982; Sobrino, F. *et al.*, 1983). Aunque el concepto de cuasiespecies se usa comúnmente para diferentes virus ARN, resulta aplicable también a virus

INTRODUCCIÓN

ADN (Isnard, M. *et al.*, 1998; López-Bueno, A. *et al.*, 2006; Ge, L. *et al.*, 2007), y se ha hecho extensivo a macromoléculas, como priones, y organizaciones celulares como bacterias y células tumorales (Solé, R. V. *et al.*, 2004; Weissmann, C. *et al.*, 2011).

Una cuasiespecie está definida por una secuencia *consenso* y una secuencia *maestra* (Figura 2.1). *Consenso* es la secuencia nucleotídica que presenta en cada posición el nucleótido más frecuente en la población y que, por tanto, no tiene por qué estar representada en la población. *Maestra* es la secuencia más frecuente en la población por tener la mayor capacidad replicativa (fitness o eficacia biológica) en el conjunto considerado (Biebricher, C. K. *et al.*, 2006b). Los cuellos de botella poblacionales que suceden en la naturaleza llevan a la separación de genomas presentes en la cuasiespecie que dan lugar a una nueva cuasiespecie, que puede diferir de la parental en la composición de los genomas integrantes y, en consecuencia, en sus propiedades biológicas (Figura 2.1).

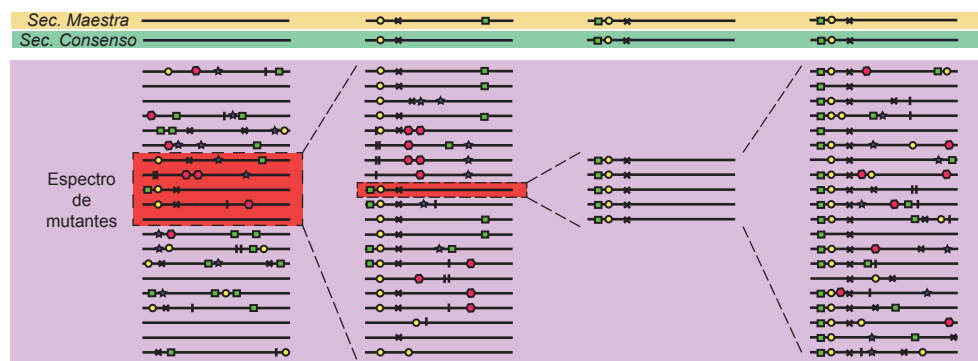


Figura 2.1. Esquema representativo de la estructura de cuasiespecies y sus mecanismos de evolución. En la parte superior se representan las secuencias *maestras* y *consenso* de cada cuasiespecie. En las columnas, se representan cuatro cuasiespecies, constituidas por genomas relacionados pero no idénticos. La selección de un número relativamente elevado (recuadro en rojo) de genomas produce una cuasiespecie cuyas secuencias *maestra* y *consenso* pueden ser diferentes entre sí y respecto a la población original. La selección de un número relativamente reducido de genomas (cuello de botella) puede dar lugar a la generación de una cuasiespecie más homogénea (secuencias *consenso* y *maestra* parecidas o idénticas).

2.2.3. Implicaciones biológicas de la dinámica de cuasiespecies

Las propiedades de una cuasiespecie no son únicamente resultado de la suma de propiedades de los genomas integrantes de la misma, sino que surgen de las interacciones, positivas (complementación) y negativas (interferencia), que suceden entre los genomas que la componen. Asimismo, los espectros de mutantes constituyen un reservorio de variantes génicas que permiten a la población la adaptación a nuevos ambientes, modificando la proporción de subpoblaciones. Estas características confieren a las cuasiespecies una elevada capacidad de adaptación a ambientes que frecuentemente son cambiantes.

El sistema inmune de un organismo infectado constituye un ambiente extremadamente hostil y cambiante. En este entorno, los virus disponen principalmente de dos herramientas para persistir y adaptarse: modulación de la respuesta inmune y evasión del sistema inmune. La modulación de la respuesta inmune desencadenada contra el virus es una estrategia frecuente entre virus ADN (Alcami, A., 2003; Seet, B. T. *et al.*, 2003). Los virus ARN, además, debido a su elevada variabilidad genética, pueden evolucionar a lo largo de una misma infección, modificando antígenos virales y evadiendo la respuesta frente a células T citotóxicas o anticuerpos neutralizantes (Borrego, B. *et al.*, 1993; Carman, W. *et al.*, 1993; Webster, D. R. *et al.*, 2009).

El reservorio de variantes genéticas presentes en los espectros de mutantes, permite la modificación del tropismo celular o de la virulencia, conjunta o independiente, entre otras alteraciones biológicas (Spear, P. G. *et al.*, 2000; Baranowski, E. *et al.*, 2003; Bergelson, J. M., 2003; Borderia, A. V. *et al.*, 2010; Domingo, E. *et al.*, 2012). La modificación del tropismo celular puede implicar el reconocimiento de nuevos receptores celulares, aunque la naturaleza de la presión selectiva que motiva este cambio no es fácil de identificar (Matloubian, M. *et al.*, 1993; Saha, K. *et al.*, 2001; Escarmís, C. *et al.*, 2008; Anhlán, D. *et al.*, 2012; Mehle, A. *et al.*, 2012).

La presencia de mutantes resistentes a una o más drogas antivirales en una cuasiespecie, posibilita que ésta pueda responder rápidamente a un tratamiento antiviral (Domingo, E. *et al.*, 1997), lo que constituye uno de los grandes desafíos para el tratamiento de infecciones víricas.

Además de la presencia de variantes genéticas en las cuasiespecies víricas, la complejidad del espectro de mutantes en su conjunto puede influir en el comportamiento y adaptabilidad de una población a diferentes ambientes. En poliovirus (PV), poblaciones de un virus mutante con fidelidad de copia incrementada mostraron una menor complejidad en la cuasiespecie, y al mismo tiempo eran incapaces de infectar el sistema nervioso central en ratones susceptibles (Pfeiffer, J. K. *et al.*, 2005; Vignuzzi, M. *et al.*, 2006), lo que constituye una prueba directa de la relevancia de la tasa de error en el comportamiento biológico de un virus.

2.3. Catástrofe de error y mutagénesis letal como estrategia antiviral

2.3.1. Catástrofe de error y mutagénesis letal

Si los virus ARN aumentan la tasa de mutación durante su replicación pueden incrementar su diversidad y heterogeneidad lo que les puede conferir aptitudes adaptativas, pero a la vez se aproximan a un umbral de error por encima del cual es imposible el mantenimiento de la información genética (Eigen, M. *et al.*, 1979; Eigen, M. *et al.*, 1988; Domingo, E. *et al.*, 2001; Vignuzzi, M. *et al.*, 2006) (Figura 2.2). A la pérdida de infectividad por superación del umbral de error, se denomina extinción por entrada en catástrofe de error (Loeb, L. A. *et al.*, 1999; Crotty, S. *et al.*, 2001; Eigen, M., 2002; Grande-Pérez, A. *et al.*, 2002; Severson, W. E. *et al.*, 2003). El umbral de error depende del grado de adaptación de la población al ambiente en el que se encuentra, así como de la complejidad de la información contenida en el genoma (que en los virus ARN puede considerarse equivalente al tamaño del genoma) que ha de ser mantenida para sobrevivir.

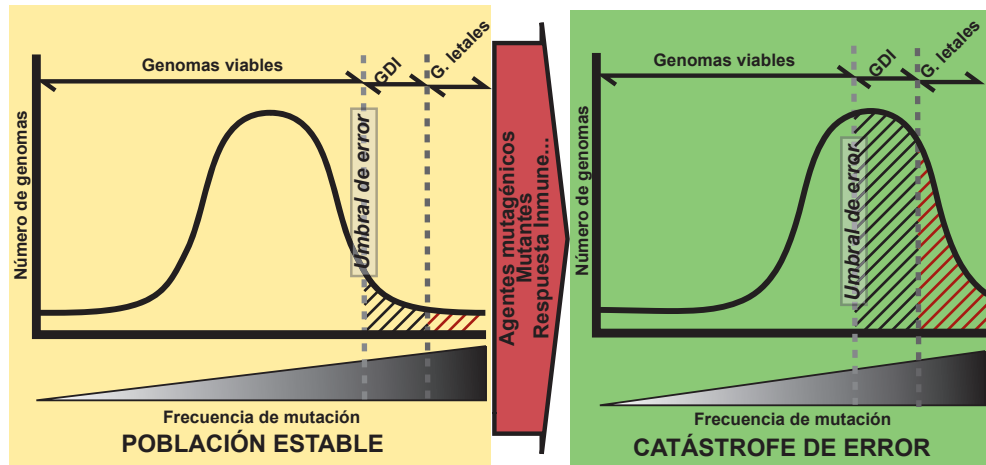


Figura 2.2. Representación gráfica de la entrada de una población en catástrofe de error. El umbral de error es el límite de la frecuencia de mutación de una población por encima del cual la información genética no puede ser mantenida generación tras generación (Eigen, 2002). El incremento de la frecuencia de mutación puede implicar la aparición de un conjunto de genomas defectores y, a mayores intensidades mutagénicas, genomas letales. La aparición de estos genomas puede conllevar la entrada en catástrofe de error de la población.

La extinción viral por el incremento artificial de la frecuencia de mutación se conoce como mutagénesis letal, un término acuñado por Loeb, Mullins y colaboradores (Loeb, L. A. *et al.*, 1999). El concepto de mutagénesis letal surgió como una extensión del modelo teórico de catástrofe de error, derivado de la teoría de cuasiespecies (Swetina, J. *et al.*, 1982). Por medio de mutagénesis letal se ha logrado la extinción del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV-1) en estudios modelo en cultivos celulares (Loeb, L. A. *et al.*, 1999; Tapia, N. *et al.*, 2005), PV (Crotty, S. *et al.*, 2001; Crotty, S. *et al.*, 2003), FMDV (Sierra, S. *et al.*, 2000; Pariente, N. *et al.*, 2003; González-López, C. *et al.*, 2004; Pariente, N. *et al.*, 2005) y LCMV (Grande-Pérez, A. *et al.*, 2002; Grande-Pérez, A. *et al.*, 2005a; Grande-Pérez, A. *et al.*, 2005b), entre otros (Domingo, E. *et al.*, 2010; Domingo, E. *et al.*, 2012).

2.3.2. Modelo de defección letal

Un número reducido de mutaciones por genoma puede llevar a la extinción de una población viral. La Dra. Ana Grande-Pérez y colaboradores obtuvieron resultados, respaldados por estudios *in silico*, que explicaban la extinción viral en LCMV por medio de defección letal empleando dosis mutagénicas reducidas que inducen la aparición de genomas defectivos interferentes (GDIs) en la población (Grande-Pérez, A. *et al.*, 2005b). Los GDIs pueden mantener su capacidad replicativa, o depender del virus silvestre para su replicación. Los GDIs que participan en defección letal mantienen su capacidad replicativa (Perales, C. *et al.*, 2007). Es conveniente distinguir entre extinción producida únicamente por un incremento notable en la frecuencia de mutación promoviendo el incremento de las mutaciones letales y aquel producido por la aparición y participación de GDI que interfieren con el virus silvestre.

2.4. El virus de la coriomeningitis linfocitaria de ratón (LCMV) como modelo de estudio de cuasiespecies virales y entrada en catástrofe de error

2.4.1. LCMV y la familia Arenaviridae

La familia Arenaviridae incluye actualmente 22 especies en un sólo género, Arenavirus, responsables de gran número de infecciones humanas consideradas emergentes que pueden ser asintomáticas o manifestarse como meningitis crónica o fiebres hemorrágicas. La familia Arenaviridae se divide en dos grupos, de acuerdo con sus propiedades antigénicas, los virus del Viejo Mundo (Old World Viruses) y virus del Nuevo Mundo (New World Viruses). Mientras que todos los virus de la familia Arenaviridae se encuentran únicamente en América o en África, LCMV posee una distribución global.

El principal reservorio de los Arenavirus son los roedores (salvo para el virus Tacaribe, cuyo hospedador natural es el murciélago) y la transmisión al ser humano se produce principalmente por contacto sanguíneo o vía aerosoles. Entre humanos, las formas más frecuentes de contagio son por transplante de órganos sólidos (Charrel, R. N. *et al.*, 2010) o transmisión vertical (Barton, L. L., 1996).

2.4.2. Estructura molecular y genómica de la partícula infecciosa de LCMV

Los viriones de los virus de la familia Arenavirus son partículas generalmente esféricas (radio medio 120 nm) aunque pueden ser pleiomórficas (de 50 a 300 nm), y pueden contener ribosomas en su interior, lo que les confiere un aspecto “arenoso” al ser observados al microscopio electrónico (Figura 2.3A). Los Arenavirus son virus con envuelta, genoma segmentado (segmentos L y S), de lectura en ambas polaridades (ambisentido) y cuyos genes no son solapantes (Figura 2.3B y C). Tanto el segmento L como el S incluyen zonas codificantes separadas por una región no codificante intergénica (IGR_L e IGR_S, respectivamente, de las siglas en inglés intergenic region) y en cada extremo de cada segmento se encuentra una región no codificante (UTR, de las siglas en inglés untranslated region). Esta región es estructuralmente estable, con elevado grado de conservación entre todos los Arenavirus y actúa como un terminador de la transcripción (Pinschewer, D. D. *et al.*, 2005). Las IGR y UTR de cada segmento constituyen elementos que actúan *in cis* y son suficientes para la transcripción y replicación en LCMV (Pinschewer, D. D. *et al.*, 2005). En segmento S codifica la nucleoproteína (NP), el precursor de las glicoproteínas (GPc) y el péptido de señal estable (SSP, de las siglas en inglés small signal peptide). GPc es procesado por la proteasa celular MBTPS1/SKI-1 en GP1, GP2 y SSP. Las proteínas GP1 y GP2 forman homotrímeros para constituir, finalmente, las espinas GP1/GP2, que decoran la superficie

INTRODUCCIÓN

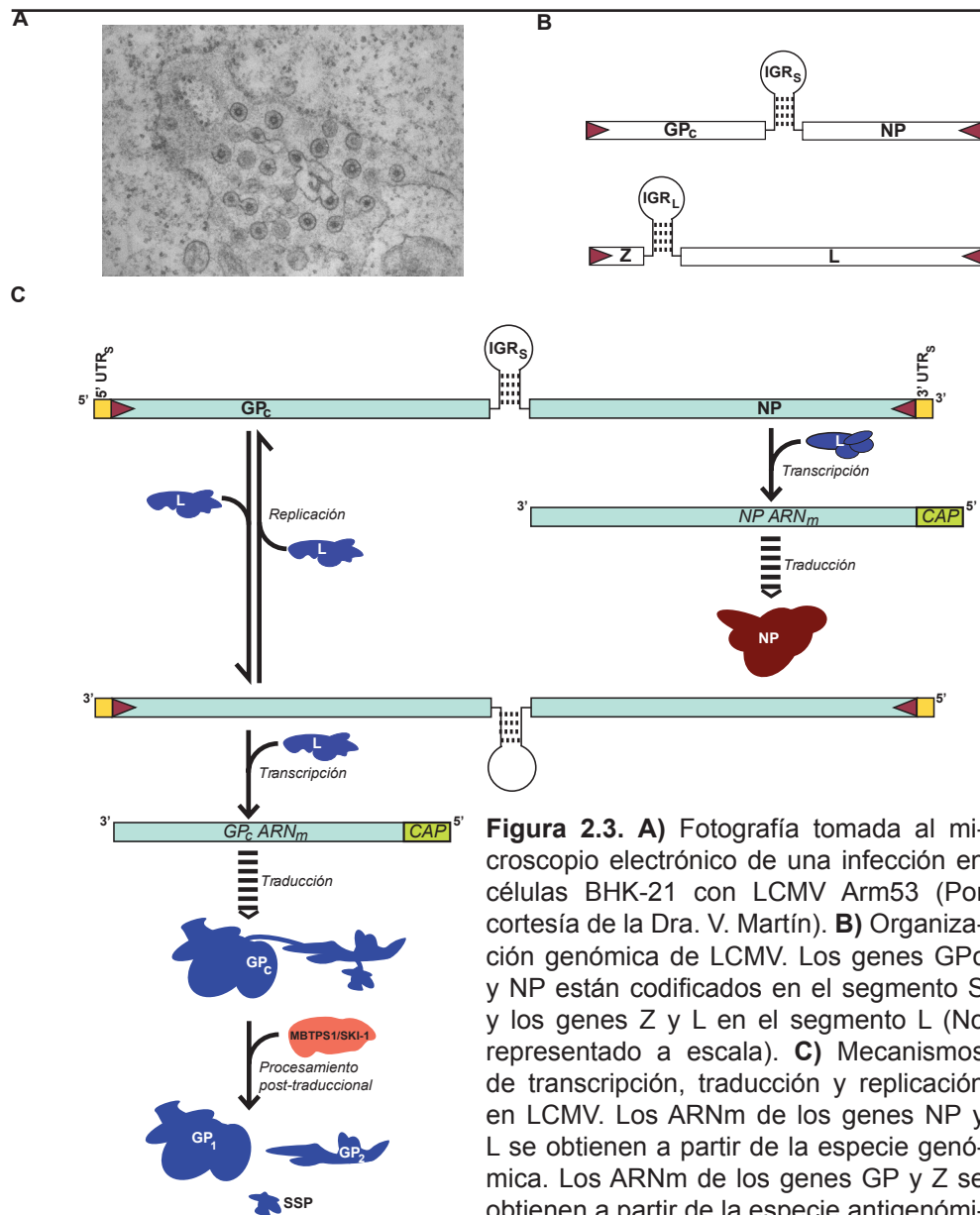


Figura 2.3. A) Fotografía tomada al microscopio electrónico de una infección en células BHK-21 con LCMV Arm53 (Por cortesía de la Dra. V. Martín). **B)** Organización genómica de LCMV. Los genes GP_c y NP están codificados en el segmento S y los genes Z y L en el segmento L (No representado a escala). **C)** Mecanismos de transcripción, traducción y replicación en LCMV. Los ARNm de los genes NP y L se obtienen a partir de la especie genómica. Los ARNm de los genes GP y Z se obtienen a partir de la especie antigenómica. Los procesos de transcripción y replicación están catalizados por la L (revisado en Pinschewer D. D. *et al.*, 2005; Burri, D. J. *et al.*, 2012; Brunotte, L. *et al.*, 2011b).

del virión (Burri, D. J. *et al.*, 2012) y median la entrada en la célula. La resolución estructural de la NP (Brunotte, L. *et al.*, 2011a) permitió determinar regiones de interacción con el ARN (Hastie, K. M. *et al.*, 2011a; Hastie, K. M. *et al.*, 2011b), la polimerasa viral (L) (Kerber, R. *et al.*, 2011) y la proteína Z

(Strecker, T. *et al.*, 2003; Livingston Macleod, J. M. *et al.*, 2011; Ortiz-Riaño, E. *et al.*, 2011). Dicha interacción con el ARN se asoció con la respuesta anti-interferón (anti-IFN) (Martínez-Sobrido, L. *et al.*, 2007; Martínez-Sobrido, L. *et al.*, 2009; Ortiz-Riaño, E. *et al.*, 2011). La NP incluye un dominio *Exo3'*-*5'*, que aunque podría participar en una actividad correctora de errores, su función en el ciclo viral permanece siendo una incógnita (Hastie, K. M. *et al.*, 2011a). SSP es un péptido de 58 residuos, altamente conservado en todos los Arenavirus, y desempeña funciones involucradas en la expresión y procesamiento de GPc y el transporte de GP1 y GP2 a la membrana celular, como parte de la salida del virus (Saunders, A. A. *et al.*, 2007).

El segmento L codifica las proteínas L y Z. La forma activa de L es un oligómero (Sánchez, A. B. *et al.*, 2005; Brunotte, L. *et al.*, 2011b), y cada monómero posee 4 dominios (Brunotte, L., *et al.*, 2011a; Brunotte, L., *et al.*, 2011b). Únicamente ha sido posible una aproximación estructural por medio de microscopía electrónica del oligómero (Kranzusch, P. J. *et al.*, 2011). La proteína L es una ARN polimerasa ARN dependiente, aunque presenta numerosas actividades adicionales, como interacción con Z (Kranzusch, P. J. *et al.*, 2011; Loureiro, M. E. *et al.*, 2011) y actividad endonucleasa posiblemente asociada a secuestro de CAP (Morin, B. *et al.*, 2010), entre otras. La proteína Z es una proteína de 90 a 99 residuos, dependiendo de la estirpe de virus, involucrada en la formación de la envuelta viral y salida del virus, probablemente mediante la formación de un complejo L:NP:Z. Z es capaz de interactuar tanto con L (Kranzusch, P. J. *et al.*, 2011), como con NP y mediar la inhibición de síntesis de ARN viral por medio de esta última interacción (Capul, A. A. *et al.*, 2012). Z, además, inhibe la producción del factor de iniciación eIF-4E, aunque no modifica los niveles de ARN celulares usados como control (Campbell Dwyer, E. J. *et al.*, 2000). La desestabilización, por medio de dos mutaciones puntuales, del dominio de dedos de zinc de la proteína Z impide la inhibición del eIF-4E, aunque sigue siendo una incógnita el papel que desempeña esta interacción en el ciclo viral.

2.5. Drogas con efectos antivirales en LCMV

2.5.1. 5-Fluorouracilo

2.5.1.1. Estructura y metabolismo del 5-fluorouracilo

El FU es un análogo de uracilo (U) con un átomo de flúor en el carbono C5 sustituyendo un átomo de hidrógeno (Figura 2.4). Fue sintetizado por primera vez por Heidelberger y colaboradores (Heidelberger, C. *et al.*, 1957) con objetivos antitumorales, fundamentándose en el empleo del me-

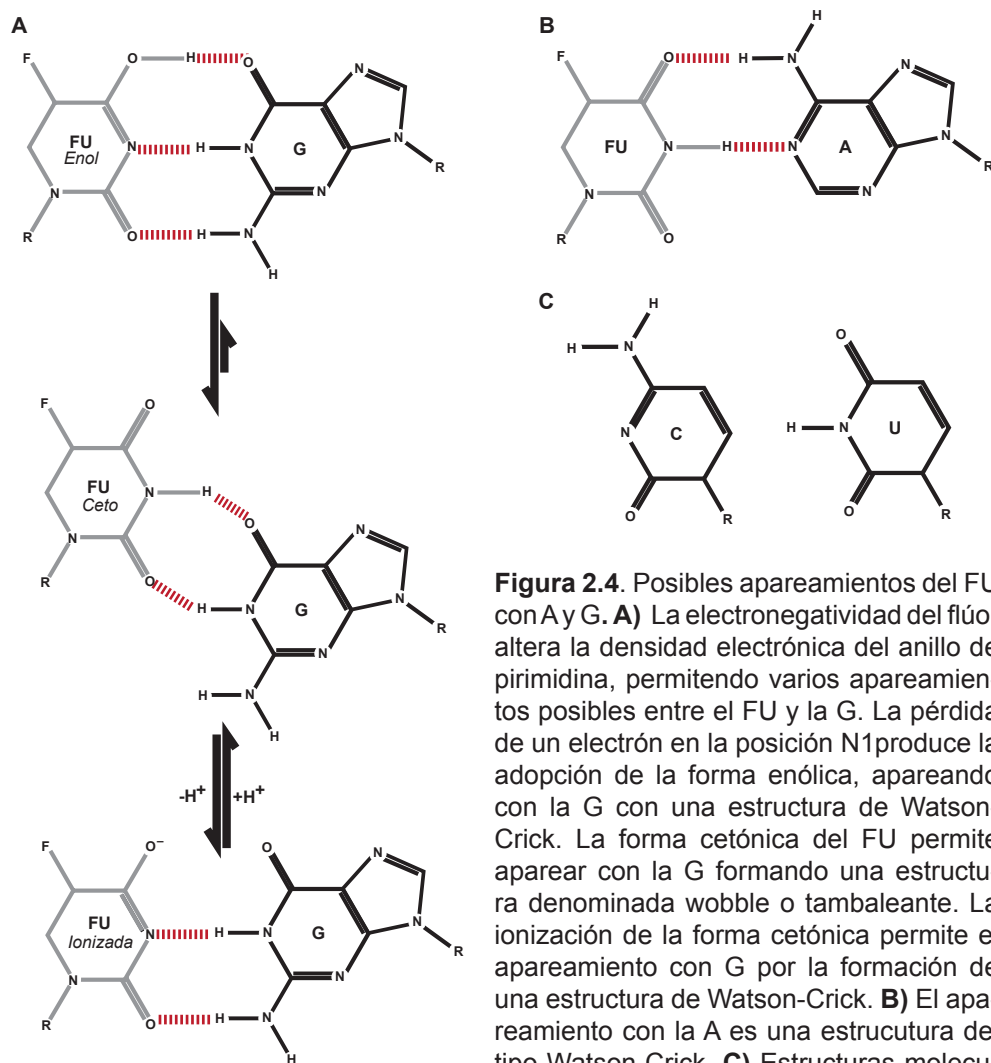


Figura 2.4. Posibles apareamientos del FU con A y G. **A)** La electronegatividad del flúor altera la densidad electrónica del anillo de pirimidina, permitiendo varios apareamientos posibles entre el FU y la G. La pérdida de un electrón en la posición N1 produce la adopción de la forma enólica, apareando con la G con una estructura de Watson-Crick. La forma cetónica del FU permite aparear con la G formando una estructura denominada wobble o tambaleante. La ionización de la forma cetónica permite el apareamiento con G por la formación de una estructura de Watson-Crick. **B)** El apareamiento con la A es una estructura del tipo Watson-Crick. **C)** Estructuras moleculares de la citosina (C) y el uracilo (U).

tabolismo del U como diana farmacológica en hepatomas (Rutman, R. J. *et al.*, 1954). Originalmente se diseñó para inhibir (como inhibidor irreversible) la enzima timidilato sintasa (*TS*), que cataliza la conversión de desoxiuridina monofosfato (dUMP) en desoxitimidina monofosfato (dTMP). La *TS* puede unirse al derivado del FU, 5-fluorodesoxiuridina-5'-monofosfato (FdUMP), estabilizando el complejo covalente entre la *TS*, FdUMP y el cofactor reducido (5,10-metilén-tetrahidrofolano), inactivando la *TS* de manera irreversible (Figura 2.5).

2.5.1.2. Efecto del 5-fluorouracilo en LCMV

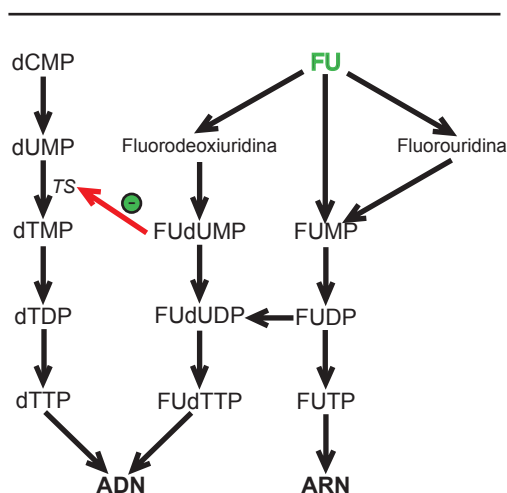


Figura 2.5. Metabolismo del FU. La fluoro-deoxiuridina monofosfato es capaz de inhibir la timidilato sintasa (*TS*), e impedir la conversión de dUMP a dTMP. Las formas trifosfato del FU (FUTP y FdUTP) pueden incorporarse al ARN y ADN en síntesis, respectivamente.

El FU puede mimetizar el U en el metabolismo celular, sufriendo las mismas reacciones que éste (Figura 2.5) y entrando en la célula por el transporte de bases pirimidinas. Principalmente, el FU es transformado a 5-fluorouridina-5'-monofosfato (FUMP). Esta reacción puede producirse de manera directa, por la orotato fosforribosil transferasa o bien por las reacciones catalizadas por la uridín transferasa y uridín quinasa, y la mediación del intermediario 5-fluorouridina (Parker, W. B. *et al.*, 1990; Longley, D.

B. *et al.*, 2003). El FUMP se fosforila por las nucleosido quinasa a 5-fluorouridina-5'-trifosfato (FUTP), o convertido a 5-fluorodesoxiuridina-5'-difosfato (FdUDP). El FdUDP puede ser fosfo- o defosforilado para dar lugar a 5-fluorodesoxiuridina-5'-trifosfato (FdUTP) ó FdUMP, respectivamente.

El FU inhibe la maduración de ARN ribosómico (ARNr) y transferente (ARNt) (Randerath, K. *et al.*, 1983; Kanamaru, R. *et al.*, 1986; Santi, D. V. *et al.*, 1987; Ghoshal, K. *et al.*, 1997) y altera la maduración de los ARN mensajeros (ARNm) (Carrico, C. K. *et al.*, 1979; Doong, S. L. *et al.*, 1988; Samuelson, T., 1991; Dolnick, B. J. *et al.*, 1993; Patton, J. R., 1993; Lenz, H. J. *et al.*, 1994). Las formas trifosfato (FUTP y FdUTP) pueden incorporarse al ARN y ADN, respectivamente, por las polimerasas celulares correspondientes. Esta característica es la principal responsable del efecto mutagénico del FU en numerosos sistemas virales (Tabla 2.1) (Gordon, M. P. *et al.*, 1959; Munyon, W. *et al.*, 1962; Dragun, M. *et al.*, 1990; Grande-Pérez, A. *et al.*, 2002; Grande-Pérez, A. *et al.*, 2005a; Agudo, R. *et al.*, 2009), aunque el desbalance en el

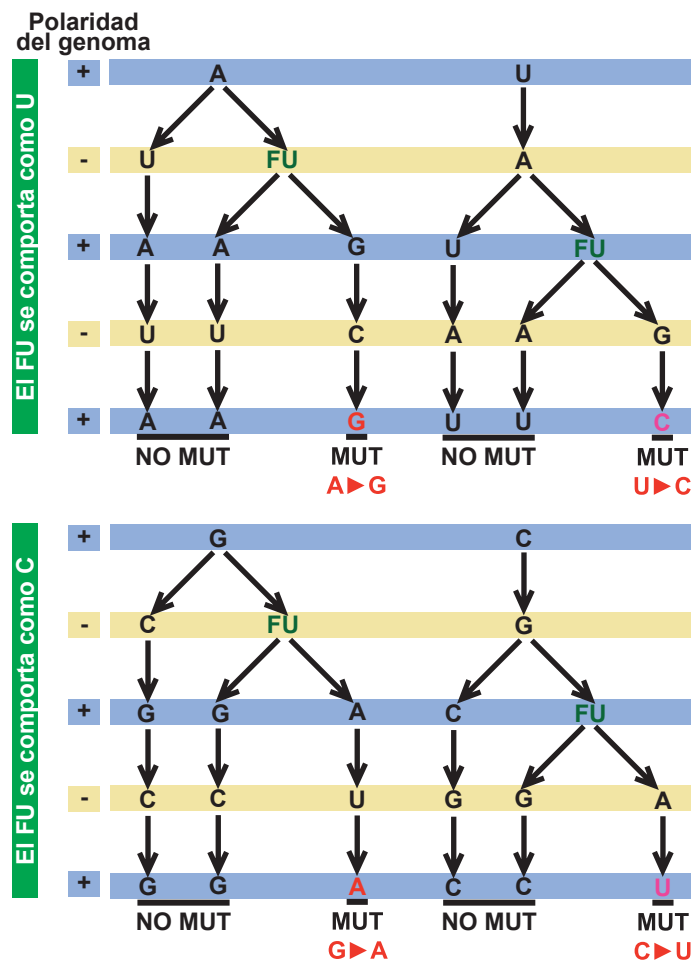


Figura 2.6. Mutaciones producidas por la incorporación de FU durante la síntesis de ARN. El FU puede aparearse tanto con A (comportándose como U) como con G (comportándose como C). Se describen dos ciclos de síntesis de cadena positiva (genómica). Dependiendo de en qué especie (genómica o antigenómica) se produzca la incorporación, el FU dará lugar mayoritariamente a transiciones A→G y U→C o las contrarias. Se indican los nucleótidos y derivados, de manera abreviada, como A, U, G, C y FU.

Familia	Género	Especie	Efecto				Referencia
			Inh. replicación	Mutágeno	Inh. Tit. viral	Otros	
<i>Arenaviridae</i>	Arenavirus	Virus de la coriomeningitis linfocitaria del ratón		✓	✓		Grande-Pérez, A <i>et al.</i> , 2002; Ruiz-Jarabo, L. <i>et al.</i> , 2003; Grande-Pérez, A. <i>et al.</i> , 2005a y b)
<i>Bunyaviridae</i>	Phlebovirus	Virus de la fiebre del valle del Rift		✓	✓		(Caplen, P. <i>et al.</i> , 1985)
<i>Coronaviridae</i>	Coronavirus	Virus de la hepatitis de ratón		✓	✓		(Haspel, L. <i>et al.</i> , 1978)
<i>Flaviridae</i>	Flavivirus	Virus de la encefalitis japonesa		✓			(Eastman y Blair., 1985)
<i>Herpesviridae</i>	Simplexvirus	Virus del herpes simple				↓EC	(Dragun, R. <i>et al.</i> , 1990)
	Cytomegalovirus	Citomegalovirus humano			✓		(Suzuki, S. <i>et al.</i> , 1985)
<i>Leviviridae</i>	Levivirus	Bacteriófago R17	✓		✓		(Graham y Kirk, 1965)
<i>Orthomyxoviridae</i>	Influenzavirus A	Virus de la gripe aviar				↓EC	(Dragun, R. <i>et al.</i> , 1990)
<i>Papillomaviridae</i>	Alfapapillomavirus	Papillomavirus humano				Extinción viral	(Niwa, T. <i>et al.</i> , 2003)
<i>Paramyxoviridae</i>	Morbilivirus	Peste bovina	✓	✓	✓		(Ghosh, N. <i>et al.</i> , 1996)
	Avulavirus	Virus de la enfermedad de Newcastle				↓EC	(Dragun, R. <i>et al.</i> , 1990)
<i>Picornaviridae</i>	Aftovirus	Virus de la fiebre aftosa	✓	✓	✓	↓EC	(Sierra, M. <i>et al.</i> , 2000; Pariente, N. <i>et al.</i> , 2001 y 2003)
	Enterovirus	Virus de la poliomielitis		✓	✓		(Cooper P. D. 1964)
<i>Rhabdoviridae</i>	Vesiculovirus	Virus de la estomatitis vesicular		✓	✓	↓EC	(Pringle C. R. <i>et al.</i> , 1970; Holland, J. <i>et al.</i> , 1990; Lee C. H., 1997)

Familia	Género	Especie	Efecto				Referencia
			Inh. replicación	Mutágeno	Inh. Tít. viral	Otros	
<i>Rhabdoviridae</i>	Tobamovirus	Virus del mosaico del tabaco	✓	✓			(Davern y Bonner, 1958; Staetin y Gordon, 1960; Wittmann y Wittmann-Liebold, 1966)
<i>Togaviridae</i>	Alfavirus	Virus de la encefalomiелitis equina del oeste				↓EC	(Dragun, R. <i>et al.</i> , 1990)

Tabla 2.1. Efecto del FU en diferentes familias de virus

nivel de desoxicitosina trifosfato y desoxiguanosina trifosfato (Parker, W. B. *et al.*, 1990; Kunz, B. A. *et al.*, 1991; Ghoshal, K. *et al.*, 1997) producido por la inhibición de la *TS* podría afectar a la replicación de algunos virus.

El FUTP puede mimetizar al UTP, siendo sustrato de la ARN polimerasa viral de LCMV, aunque puede aparear, durante la replicación, con residuos de guanina (G) y adenina (A) (Figura 2.6) (Lasken, R. S. *et al.*, 1984; Yu, H. *et al.*, 1993). En caso de que, durante la replicación, el FU se comporte mayoritariamente como U, las mutaciones observadas serán A→G y U→C, mientras que si se comporta como C serán G→A y C→U (Figura 2.6). En nuestro laboratorio se ha demostrado el incremento en frecuencia de mutación en LCMV al tratarse con FU respecto a infecciones en ausencia de droga, produciendo un incremento en el sesgo A→G y U→C (Grande-Pérez, A. *et al.*, 2002; Ruiz-Jarabo, C. M. *et al.*, 2003; Grande-Pérez, A. *et al.*, 2005a; Grande-Pérez, A. *et al.*, 2005b; Martin, V. *et al.*, 2010; Moreno, H. *et al.*, 2012).

2.5.2. Ribavirina

2.5.2.1. Estructura y metabolismo de la ribavirina

La Rib, 1-β-D-ribofuranosil-1H-1,2,4-triazol-3-carboxamida o Virazol (Figura 2.7) es un agente antiviral sintético de amplio espectro que se comporta como un análogo de base purínica durante la replicación de sistemas basados en ARN, y, además, es capaz de inhibir la síntesis de ARN, ADN y proteínas en las células tratadas (Müller, W. E. *et al.*, 1977).

La fosforilación de la Rib por la adenosina quinasa da lugar a la ribavirina-5'-monofosfato (RMP), que por acción de nucleosido mono- y difosfato quinazas, da lugar a su vez a ribavirina-5'-trifosfato (RTP) (Willis, R. C. *et al.*, 1978; Balzarini, J. *et al.*, 1993; Gallois-Montbrun, S. *et al.*, 2003) (Figura 2.8). La RMP es capaz de inhibir efectivamente la inosín monofosfato deshidrogenasa (IMPDH) (Figura 2.8), afectando a las rutas de biosíntesis

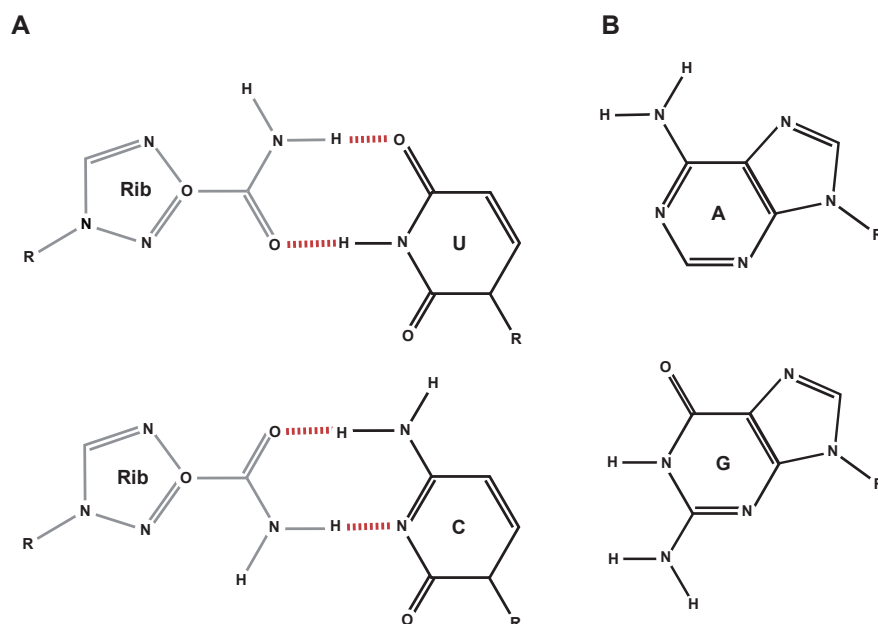


Figura 2.7. A) Apareamiento de la Rib con U y C. Los apareamientos tanto con U como con C se producen por la formación de una estructura del tipo Watson-Crick. **B)** Estructura molecular de la adenosina (A) y guanosina (G).

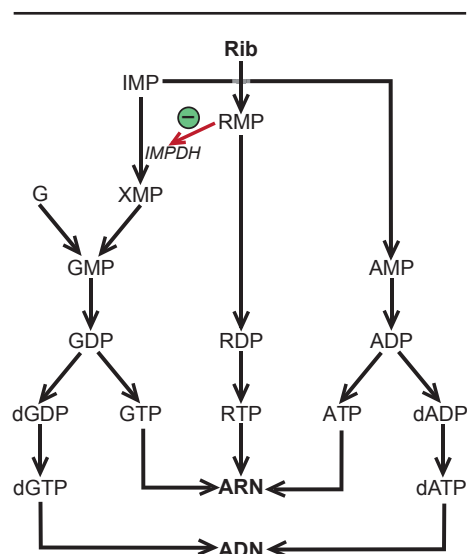


Figura 2.8. Metabolismo de la Rib. La forma monofosfato de la Rib (RMP) es capaz de inhibir la inosina monofosfato deshidrogenasa (*IMPDH*), reduciendo la cantidad de GMP y alterando el balance de nucleótidos intracelulares (Airaksinen et al., 2003).

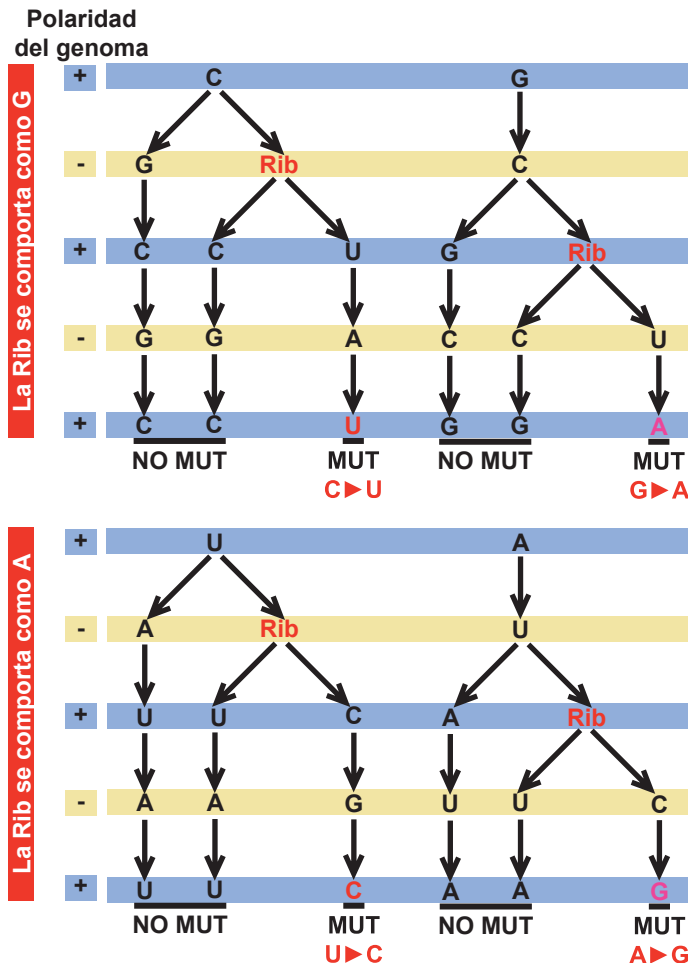
de nucleótidos que dependen de esta enzima (Streeter, D. G. *et al.*, 1973). La RTP puede ser incorporada al ARN en síntesis en numerosos virus (Tabla 2.1), como en el virus del Oeste del Nilo (Jordan, I. *et al.*, 2000; Crance, J. M. *et al.*, 2003; Day, C. W. *et al.*, 2005), el virus Hantaan (Severson, W. E. *et al.*, 2003; Chung, D. H. *et al.*, 2007), y numerosos picornavirus (Crotty, S. *et al.*, 2000; Crotty, S. *et al.*, 2001; Airaksinen, A. *et al.*, 2003; Sierra, M. *et al.*, 2007).

Dada la similitud entre la Rib y las bases purínicas, en los sistemas virales en los que la Rib puede incorpo-

rarse a la cadena de ARN en síntesis, puede aparear con C o con U (Figuras 2.7 y 2.9). Dependiendo de las polimerasas virales y de su interacción con la Rib, las mutaciones más observadas serán C→U y G→A (en caso de que la Rib se comporte mayoritariamente como G) o U→C y A→G (en caso de que el comportamiento predominante sea como A). En nuestro laboratorio se ha demostrado que el sesgo mutacional en cultivos celulares de la Rib en FMDV es C→U y G→A (Airaksinen, A. *et al.*, 2003; Sierra, M. *et al.*, 2007; Agudo, R. *et al.*, 2010), aunque en algunos estudios *in vitro* no se ha observado esa tendencia (Arias, A. *et al.*, 2008).

2.5.2.2. Uso de la ribavirina en tratamientos antivirales

La actividad antiviral de la Rib fue descubierta en los laboratorios de ICN Pharmaceuticals (Streeter, D. G. *et al.*, 1973; Sidwell, O. W. *et al.*, 1974)



y los primeros estudios en cultivos celulares e *in vivo* datan de 1975. Inicialmente su uso estaba orientado principalmente al tratamiento de infecciones del virus de la gripe (Sidwell, O. W. *et al.*, 1974; Durr, F. E. *et al.*, 1975; Oxford, J. S., 1975) aunque los primeros resultados en el tratamiento contra la hepatitis fueron un año más tarde (Sidwell, O. W. *et al.*, 1974; Ayrosa-Galvão, P. A. *et al.*, 1977). Actualmente constituye el tratamiento de elección contra el virus de Lassa (LSV) (McCormick, J. B. *et al.*, 1986; Bausch, D. G. *et al.*, 2010), contra el virus de la fiebre hemorrágica Crimea-Congo (Fisher-Hoch, S. P. *et al.*, 1995; Mardani, M. *et al.*, 2003), y junto con el interferón

INTRODUCCIÓN

Familia	Género	Especie	Efecto				Referencia
			Inh. replicación	Mutágeno	Inh. Tit. viral	Otros	
<i>Arenaviridae</i>	Arenavirus	Virus de la coriomeningitis linfocitaria de ratón	✓	✓	✓		(Ruiz-Jarabo, C. M. <i>et al.</i> 2003; Moreno, H. <i>et al.</i> 2011)
		Virus de la fiebre de Lassa			✓		(Huggins, J. W. 1989)
		Virus de Pinchinde			✓		(Kenyon, R. <i>et al.</i> , 1986; Smees, D. F. <i>et al.</i> , 1993)
		Virus Junin				↓EC	(Kenyon, R. H. <i>et al.</i> 1986)
<i>Deltaviridae</i>	Deltavirus	Virus de la hepatitis delta	✓				(Chung, D. H. <i>et al.</i> , 2007)
<i>Bunyaviridae</i>	Bunyavirus	San Ángel			✓		(Smees, D. F. <i>et al.</i> , 1993)
	Hantavirus	Virus Hantaan	✓	✓		↓ Sint. Proteínas	(Severson, W. E. <i>et al.</i> , 2003; Chung, D. H. <i>et al.</i> , 2007)
		Virus sin nombre			✓		(Medina, M. <i>et al.</i> , 1993)
	Nairovirus	Virus de la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo			✓		(Watts, D. M. <i>et al.</i> , 1989)
	Phlebovirus	Virus de la fiebre siciliana			✓	↓EC	(Crance, J. M. <i>et al.</i> , 1997; García, S. <i>et al.</i> , 2001)
		Virus de la fiebre del valle del Rift			✓	↓EC	
<i>Flaviviridae</i>	Flavivirus	Virus del Dengue 1, 2 y 4	✓			↓EC	(Crance, J. M. <i>et al.</i> , 2003; Takhampunya, R. <i>et al.</i> , 2006)
		Virus de la encefalitis japonesa				↓EC	Crance J. M. <i>et al.</i> , 2003
		Virus de Langat				↓EC	
		Virus de Usutu				↓EC	
		Virus de Wesselsbron				↓EC	

Familia	Género	Especie	Efecto				Referencia
			Inh. replicación	Mutágeno	Inh. Tít. viral	Otros	
Flaviviridae	Flavivirus	Virus de la fiebre amarilla				↓EC	Crance J. M. <i>et al.</i> , 2003
		Virus de Zika				↓EC	
		Virus del oeste del Nilo	✓	✓	✓	↓EC	(Jordan, I <i>et al.</i> , 2000; Crance, J. M. <i>et al.</i> , 2003; Day C. W. <i>et al.</i> , 2005)
	-	Virus GB-B	✓	✓	✓		(Lanford, R. E. <i>et al.</i> , 2001)
	Hepacivirus	Virus de la Hepatitis C	✓	✓	✓		(Contreras, A. M. <i>et al.</i> , 2002; Zhou, S. <i>et al.</i> 2003; Kanda, T. <i>et al.</i> , 2004; Asahina, Y <i>et al.</i> , 2005)
Orthomixoviridae	Influenzavirus	Virus de la gripe A				↓EC	(Wray, S. K. <i>et al.</i> 1985a y b; Shigeta, S. <i>et al.</i> , 1997)
		Virus de la gripe B				↓EC	(Wray, S. K., <i>et al.</i> 1985a y b)
Paramyxoviridae	Metapneumovirus	Metapneumovirus humano				↓EC	(Wyde, P. R. <i>et al.</i> , 2003)
	Morbillivirus	Virus del sarampión				↓EC	
	Pneumovirus	Virus humano sincitial				↓EC	
		Virus sincitial bovino	✓				(Bartzatt and Anderson 1989)
Picornaviridae	Aftovirus	Virus de la fiebre aftosa		✓	✓		(de la Torre, J. C. <i>et al.</i> , 1987; Airaksinen, A. <i>et al.</i> , 2003; Sierra, M. <i>et al.</i> 2007)
	Enterovirus	Poliovirus	✓	✓	✓		(Crotty, S. <i>et al.</i> 2000; Crotty, S. <i>et al.</i> , 2001)

Familia	Género	Especie	Efecto				Referencia
			Inh. replicación	Mutágeno	Inh. Tít. viral	Otros	
<i>Poxviridae</i>	Orthopoxvirus	Virus vaccinia	✓				(Smee, D. F. <i>et al.</i> , 2001)
<i>Rhabdoviridae</i>	Novirhabdovirus	Virus de la septicemia hemorrágica vírica	✓				(Marroquí, L. <i>et al.</i> , 2007)
<i>Retroviridae</i>	Lentivirus	Virus de la inmunodeficiencia humana	✓		✓		(McCormick, J. B. <i>et al.</i> , 1984; Frank, K. B. <i>et al.</i> , 1987)
		Virus Visna Maedi	✓		✓		
<i>Togaviridae</i>	Alphavirus	Virus de Chikungunya			✓	↓EC	(Andrei and De Clercq 1993)
		Virus de Semliki			✓		(van Tiel, F. H. <i>et al.</i> , 1986)
<i>Coronaviridae</i>	Coronavirus	Virus del SARS	✓				(Morgenstern, B. <i>et al.</i> 2005)

Tabla 2.1. Efecto de la Rib en diferentes familias de virus

pegilado (IFNp), contra el virus de la hepatitis C (HCV) (Rockstroh, J. K. *et al.*, 2008; Brook, G. *et al.*, 2010) (Tabla 2.2). Su mecanismo de acción sigue siendo una incógnita tanto para las infecciones por HCV como en otras enfermedades víricas (Paeshuyse, J. *et al.*, 2011).

2.5.2.3. Mecanismos antivirales propuestos para la ribavirina en virus ARN

Entre los posibles mecanismos de acción de la Rib en virus ARN están:

1. Inhibición de la inosín monofosfato deshidrogenasa

El mecanismo inicialmente propuesto para dar explicación al efecto antiviral de la Rib era el desbalance de los niveles de nucleótidos por la in-

hibición competitiva de la *IMPDH* por la RMP (Streeter, D. G. *et al.*, 1973) (Figura 2.8). Como consecuencia de esta inhibición, la concentración intracelular de derivados de guanosina (GMP, GDP y GTP) se ve reducida, pudiendo afectar al funcionamiento de la maquinaria celular y viral, durante la replicación. La adición de G al medio de cultivo atenúa o elimina el efecto antiviral ejercido por la Rib (Streeter, D. G. *et al.*, 1973; Wray, S. K. *et al.*, 1985a; Wray, S. K. *et al.*, 1985b; Scheidel, L. M. *et al.*, 1987; Jordan, I. *et al.*, 2000; Airaksinen, A. *et al.*, 2003; Chung, D. H. *et al.*, 2007). Las maquinarias celular y viral están adaptadas a un balance determinado entre los diferentes nucleótidos, y su alteración podría ocasionar la inhibición de la replicación viral. Asimismo, el descenso del GTP intracelular puede inducir a la polimerasa viral a incorporar nucleótidos erróneos en lugar del GTP, produciendo un incremento en la frecuencia de mutación (Stuyver, L. J. *et al.*, 2002; Airaksinen, A. *et al.*, 2003).

II. Mutagénesis por incorporación directa a la cadena en síntesis

La Rib es un análogo de base purínica, que puede incorporarse al metabolismo de nucleósido-trifosfatos e incorporarse a la cadena de ARN viral en síntesis (Crotty, S. *et al.*, 2000; Crotty, S. *et al.*, 2001; Lanford, R. E. *et al.*, 2001; Severson, W. E. *et al.*, 2003; Freistadt, M. S. *et al.*, 2004; Day, C. W. *et al.*, 2005). Su apareamiento tanto con U como con C puede conllevar el incremento de la frecuencia de mutación durante la replicación viral (Figuras 2.7 y 2.9).

El carácter mutagénico de la Rib se demostró por primera vez en PV (Crotty, S. *et al.*, 2000). En nuestro laboratorio se han obtenido pruebas del efecto mutagénico de la Rib para FMDV (Airaksinen, A. *et al.*, 2003; Sierra, M. *et al.*, 2007; Agudo, R. *et al.*, 2010b; Ferrer-Orta, C. *et al.*, 2010). Además se han descrito mutantes resistentes a Rib que presentaban un aumento significativo en la fidelidad de copia por la ARN polimerasa viral o una modificación del sesgo de mutaciones observado en ausencia de droga (Sierra, S. *et al.*, 2007).

al., 2000; Agudo, R. *et al.*, 2010b). Ambos mecanismos confieren al FMDV una sensibilidad disminuida a la Rib.

Aunque el efecto mutagénico de la Rib en HCV en cultivos celulares ha sido descrito (Vo, N. V. *et al.*, 2003; Hofmann, W. P. *et al.*, 2007; Hofmann, W. P. *et al.*, 2008), el efecto mutagénico *in vivo* permanece siendo un tema de discusión (Domingo, E. *et al.*, 2007), habiendo en la bibliografía resultados a favor (Asahina, Y. *et al.*, 2005; Cuevas, J. M. *et al.*, 2009) y en contra (Chevaliez, S. *et al.*, 2007) de dicho fenómeno, aunque recientemente ha adquirido peso el concepto de que la Rib actúa, al menos en parte, como un agente mutagénico.

III. Inhibición de la maquinaria celular y viral implicada en el ciclo viral

La inhibición sobre la replicación viral ejercida por la Rib puede estar mediada por mutagénesis incrementada, aunque en algunos casos es posible diseccionar la actividad inhibitoria ejercida a través de la polimerasa viral y la actividad inhibitoria ejercida como consecuencia de la mutagénesis incrementada. En VSV, cualquiera de las tres especies fosforiladas de la Rib es capaz de inhibir la transcripción *in vitro* (Toltzis, P. *et al.*, 1988; Fernandez-Larsson, R. *et al.*, 1989) sin que se observe incorporación de la droga a la cadena en síntesis o transcritos de tamaño anormal, que serían el resultado de una acción terminadora de cadena de la Rib. En el virus de la gripe, la RTP afecta a la generación del oligonucleótido cebador durante el inicio de la replicación y su posterior elongación (Wray, S. K. *et al.*, 1985).

La mayor parte de los ARNm celulares poseen en su extremo 5' una estructura de 7-metil-guanosina (CAP), que les confiere estabilidad y permite su traducción. A la incorporación del CAP al ARNm se conoce como *capping*. Al ser la Rib un análogo de G, es posible la interacción de la droga con la maquinaria responsable del *capping* (Goswami, B. B. *et al.*, 1979; Wray, S. K. *et al.*, 1985; Zhou, S. *et al.*, 2003; Benarroch, D. *et al.*, 2004; Bougie, I.

et al., 2004). En LCMV, los ARNm virales poseen CAP de procedencia celular, gracias al mecanismo conocido como secuestro de CAP (Morin, B. *et al.*, 2010). Por lo tanto, la inhibición del *capping* celular puede afectar a la replicación de LCMV. Tanto la desestabilización de la interacción entre la proteína Z y el eIF-4E como la inhibición de la formación del CAP por la Rib podrían afectar a la síntesis de proteínas virales, ejerciendo así un efecto antiviral.

Los mecanismos por los que la Rib, o cualquiera de sus derivados fosforilados, afectan la maquinaria viral son variados y, en la mayor parte de ocasiones, no actúan de manera individual o aislada, sino que es un conjunto de mecanismos el que produce el efecto antiviral global.

IV. Inmunomodulación

Resultados obtenidos de pacientes infectados con HCV y tratados con interferón pegilado (IFNp) y Rib sugieren que la Rib podría activar el cambio de las células T-Helper tipo 1 a tipo 2 al ser comparados con pacientes tratados únicamente con IFNp (Hultgren, C. *et al.*, 1998; Ning, Q. *et al.*, 1998; Tam, P. E. *et al.*, 1999). La activación de la respuesta inmune por células *T-Helper 1* está asociada a la expresión de IL-2, IFN- γ y factor α de necrosis tumoral y está asociada al carácter crónico de la infección por HCV. Estos resultados sugieren que, al menos en parte, los cambios en la respuesta inmune producidos por la Rib son responsables del efecto antiviral ejercido por la Rib sobre HCV.

2.5.2.4. Efecto de la ribavirina en LCMV

La Rib es un agente antiviral empleado contra infecciones de Arenavirus (Jahrling, P. B. *et al.*, 1980; Jahrling, P. B. *et al.*, 1984; Kenyon, R. H. *et al.*, 1986; Lucia, H. L. *et al.*, 1989; Smee, D. F. *et al.*, 1993; Enria, D. A. *et al.*, 1994; Ruiz-Jarabo, C. M. *et al.*, 2003; Moreno, H. *et al.*, 2011; Ölschläger, S. *et al.*, 2011), y su efecto mutagénico para LCMV ha sido demostrado en el

***I*NTRODUCCIÓN**

trabajo de la presente tesis doctoral (Moreno, H. *et al.*, 2011). Los mecanismos por los que la Rib puede ejercer su efecto antiviral en los virus de este género pueden ser comunes a los enumerados anteriormente para otros virus ARN: inhibición de la *IMPDH*, mutagénesis incrementada, inhibición de la maquinaria celular/viral e inmunomodulación.

OBJETIVOS

“La formulación de un problema, es más importante que su solución”

Albert Einstein (1879-1955)

Físico alemán

3. Objetivos

3.1. Caracterización de poblaciones de LCMV obtenidas en ausencia y presencia de 5-fluorouracilo a multiplicidades de infección comprendidas entre 0.001 y 10 UFP/cél.

3.2. Estudio del mecanismo de acción antiviral de la ribavirina en LCMV.

3.3. Estudio de terapias antivirales secuenciales y de combinación en LCMV empleando ribavirina y 5-fluorouracilo.

3.4. Caracterización biológica de mutantes de la nucleoproteína de LCMV

MATERIALES Y MÉTODOS

Usa el método científico: probando varias veces, llegarás a la verdad.

*Marco Tulio Cicerón (106 a.C.-43 a.C.)
Jurista, político, filósofo, escritor y orador romano.*

4. Materiales y métodos

4.1. Cultivo de células eucariotas

Para las infecciones con LCMV se emplean las siguientes líneas celulares: fibroblastos de riñón de hámster (BHK-21), células BHK-21 transfectadas permanentemente con un plásmido de expresión constitutiva de la NP de LCMV (BHK-21_{NP}), células epiteliales de riñón de mono verde africano Chlorocebus (Vero) y células A549, de tejido canceroso de pulmón humano. Las células BHK-21, BHK-21_{NP} y Vero se crecen como se describe en (Grande-Pérez, A. *et al.*, 2002). Las células Vero se cultivan en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Dulbecco, R. *et al.*, 1959), con 5% de suero fetal bovino (SFB; Gibco, BRL), aminoácidos no esenciales (Sigma), 2% de glutamina (Sigma), 50 µg/ml de gentamicina (Sigma) y 0.00002% de parahidroxibenzoato de butilo (Sigma) como antimicótico. A dicho medio DMEM suplementado se denomina en la presente tesis doctoral DMEM completo (DMEMc). Las células BHK-21 y BHK-21_{NP} se cultivan en medio DMEMc, con 5% de SFB y las células A549 en medio DMEMc suplementado con 5% de SFB. Todas las líneas celulares se incuban hasta la confluencia deseada a 37°C, 7% de CO₂ y 98% de humedad. Cuando están confluentes, se separan de la placa por tratamiento con tripsina-EDTA (Sigma) durante 2 minutos y se siembran a la dilución apropiada.

4.2. Virus utilizados

4.2.1. LCMV

En la presente tesis doctoral se emplean dos cepas del LCMV: Arms-

MATERIALES Y MÉTODOS

trong 53b (LCMV Arm53) y Clon13 (LCMV Cl13). LCMV Arm53 es un clon obtenido a partir de LCMV Arm CA por triple purificación de placa y pasado cuatro veces en células BHK-21. LCMV Clon13 se obtuvo por doble purificación de placa a partir de esplenocitos procedentes de ratones BALB/c infectados con LCMV Arm-CA (Matloubian, M. *et al.*, 1993).

Para los experimentos de exclusión de reinfección se usan virus tri-segmentados derivados de LCMV (3rLCMV) (Emonet, S. F. *et al.*, 2009) que disponen de dos segmentos S, cada uno portador de un gen marcador (GFP ó RFP) y un gen viral (NP ó GPc). La necesidad de que cada partícula incorpore todos los componentes virales obliga a mantener, en cada partícula infecciosa, una copia de cada uno de los tres segmentos. A los virus portadores del gen de la GFP y la RFP se denominan 3rLCMV/GFP y 3rLCMV/RFP, respectivamente.

M & m

4.2.2. Otros virus

Además se han utilizado el virus de la encefalomiocarditis (EMCV) cepa Rueckert (Hall, L. *et al.*, 1971), el VSV cepa Mudd-Summers del serotipo Indiana (Mudd, J. A. *et al.*, 1973) y el FMDV, obtenido a partir del clon infeccioso CS8c1 (Sobrino, F. *et al.*, 1983).

4.3. Drogas empleadas

Las drogas empleadas en los experimentos realizados son el FU, (Sigma), la Rib (Sigma), el ácido micofenólico (AMF, Sigma), el IFN α humano 2B (IFN α , GenScript, cedido por J. Quer) y la G. Para la preparación de los medios se parte de disoluciones en DMEMc de FU 5mg/ml, Rib, AMF y G a 0.1 mM. Las disoluciones se esterilizan por filtración. Estos preparados se mantienen a 4°C durante el tiempo de empleo y se guardan congelados a

-80°C de manera indefinida. La toxicidad del FU y la Rib para células BHK-21 ha sido descrita previamente en (Holland, J. J. *et al.*, 1990; Sierra, S. *et al.*, 2000; Airaksinen, A. *et al.*, 2003; Pariente, N. *et al.*, 2003). Para las infecciones en presencia de drogas se preincuba la monocapa 12 horas en presencia de la droga relevante para permitir la absorción de la misma y la inducción del estado celular antiviral producido por la misma.

4.4. Infecciones virales

4.4.1. Infecciones virales de células BHK-21, BHK-21_{NP} ó A549 en medio líquido

Los métodos de infección de células BHK-21 en medio líquido y los controles para asegurar la ausencia de contaminaciones (mantenimiento de cultivos no infectados en paralelo y otros controles) han sido descritos previamente (Baranowski, E. *et al.*, 1998). Las infecciones en placas de 100 mm se realizan con la cantidad de virus deseada diluida en 1ml de medio DMEMc. Los pases seriados, en los que el título viral del pase previo se desconoce, se realizan empleando 1ml de sobrenadante de la infección previa. Las infecciones con LCMV se realizan a una confluencia celular comprendida entre el 70% y el 90%. Las infecciones con EMCV, VSV o FMDV se realizan a una confluencia celular del 100%, siguiendo los métodos previamente establecidos en nuestro laboratorio (Domingo, E. *et al.*, 1980; Sobrino, F. *et al.*, 1983; de la Torre, J. C. *et al.*, 1987).

4.4.2. Infecciones de LCMV en medio semisólido en células Vero

Para determinar el número de unidades formadoras de placa (UFP) presentes en una muestra (título viral, UFP/ml) se realizan infecciones en células Vero de acuerdo con lo descrito anteriormente (Grande-Pérez, A. *et al.*, 2002). Se infectan células Vero a una confluencia del 70-90% (en pocillos

MATERIALES Y MÉTODOS

de placas multipocillo de 35 mm diámetro, Falcon) con 300 µl de inóculo de diluciones seriadas de la muestra problema. Las diluciones se realizan en DMEMc sin SFB. Tras 90 minutos de adsorción a 37°C, 7% de CO₂ y 98% de humedad relativa, se retira el inóculo y se añade medio semisólido. Dicho medio se compone de 50% de DMEM 2x, 46% de agar al 0.6%, 1% de SFB, 1% de DEAE-dextrano y 2% de glutamina. Tras 7 días de incubación, se fijan las células con formaldehído al 2% y se tiñen con cristal violeta (2% de cristal violeta en formaldehído al 2%). Todas las titulaciones se han realizado, como mínimo, por triplicado.

4.4.3. Infecciones de LCMV en medio líquido en células Vero

Para determinar el título viral de manera alternativa a lo descrito en el punto 4.4.2 se infectan en células Vero sembradas en placas multipocillo de 96 pocillos (Nunc) con una confluencia del 70-90% con diluciones seriadas de la muestra problema en 100 µl de DMEMc suplementado con 2% SFB. Se incuban a 37° C, 7% CO₂ y 98% de humedad relativa durante 20 horas, tras las que se fijan con formaldehído al 2% durante 30 minutos, como mínimo, a temperatura ambiente. Se lava dos veces la monocapa con PBS, se añaden 200 µl de solución bloqueante y se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente. Se lava dos veces la monocapa con PBS y se añaden 30 µl de anticuerpo 1·1·3 (anticuerpo primario monoclonal procedente de células de hibridoma contra la NP de LCMV, cedido por el Dr. Juan Carlos de la Torre) diluido en tampón de dilución. Se incuba 1 hora a temperatura ambiente. Se lava la monocapa dos veces con PBS y se añaden 30 µl de anticuerpo secundario. El anticuerpo secundario empleado dependió del objetivo perseguido en cada experimento, indicándose en cada ocasión particular. Se incuba durante 40 minutos a temperatura ambiente. Se lava la monocapa dos veces con PBS y se tiñe con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), para teñir los núcleos celulares. Se lava la monocapa dos veces con PBS y se añaden 30 µl de PBS. Las placas

se almacenan durante un máximo de 5 días a 4°C y protegidas de la luz. Las placas se observan al microscopio de fluorescencia y se cuentan las células fluorescentes (el color dependerá del anticuerpo secundario utilizado durante el experimento), que indican las células infectadas por el virus.

4.4.4. Infecciones de FMDV, EMCV y VSV en medio semisólido en células BHK-21

Para la determinación del título viral de FMDV, EMCV o VSV (UFP/ml) se realizan infecciones en células BHK-21 en medio semisólido (Domingo, E. *et al.*, 1980; Sierra, M. *et al.*, 2007). Se infectan $2-4 \times 10^6$ células BHK-21 (en placas de 60 mm de diámetro, Nunc) con 500 µl de inóculo de diluciones seriadas de la muestra problema. Las diluciones se realizan en DMEMc sin SFB. Tras 60 minutos de adsorción a 37°C, 7% de CO₂ y 98% de humedad relativa, se retira el inóculo y se añade medio semisólido. Este medio consiste en 50% de DMEM 2x, 48% de agar al 1% (0.5% de concentración final) 1% de SFB y 1% de DEAE-dextrano. Tras 24 horas de incubación, se fijan las células con formaldehído al 2% y se tiñen con cristal violeta (2% de cristal violeta en formaldehído al 2%). Todas las titulaciones están realizadas, como mínimo, por triplicado.

4.5. Extracción de ARN viral

La extracción del ARN presente en el sobrenadante se realiza mediante tratamiento con Trizol (Gibco) tal y como indica el proveedor (Sierra, M. *et al.*, 2007). El ARN extraído se precipita en 1 volumen de isopropanol, se lava con etanol al 70% y se resuspende en 50 µl de agua miliQ destilada y libre de nucleasas. Se incuba a 70° C durante 5 minutos para deshacer las posibles estructuras secundarias que pueda adoptar el ARN y se congela a -80° C para su almacenamiento.

4.6. Obtención de ADNc

Para obtener el ADNc a partir del ARN viral se incuba la muestra a 70° C y se mantiene en hielo hasta su utilización. Para la reacción de retrotranscripción se emplea la RT Transcriptor (Roche), y se siguen las instrucciones proporcionadas por el fabricante. La reacción consiste en una incubación de 45 minutos a 55° C (reacción de retrotranscripción) seguida de 5 minutos a 85° C (inactivación de la retrotranscriptasa).

4.7. Amplificación del ADNc viral

Para amplificar el ADNc se emplea la enzima Pfu Ultra (Promega), para evitar la incorporación de mutaciones artefactuales producidas por una polimerasa de baja fidelidad (Arias, A. *et al.*, 2001; Airaksinen, A. *et al.*, 2003). Se siguen las instrucciones del fabricante para la reacción de PCR. Por defecto, las reacciones de PCR se configuran de acuerdo con el siguiente esquema:

Temperatura	Tiempo	Ciclos
95° C	10'	1
95° C	30''	30
55° C	1' 30''	
72° C	1'	
72° C	10'	1
4° C	max. 8h	1

Los productos amplificados por PCR se analizan en un gel de agarosa al 1% preteñido con SYBR-SAFE (Invitrogen Molecular Probes). Los oligonucleótidos empleados dependen del gen amplificado y del objeto de estudio para el cual se realiza la PCR y se detallan en la Tabla 4.1.

4.8. Mutagénesis dirigida por PCR

Para la obtención de mutantes en la NP de LCMV se realizaron dos reacciones de PCR consecutivas, partiendo del plásmido #414 (Tabla 4.2). Para este propósito se emplea la ADN polimerasa Extender (5' Prime) y se siguen las recomendaciones del fabricante. Para cada mutante, en la primera reacción de PCR (PCR mutagénica), se emplean los oligonucleótidos que aparecen recogidos en la Tabla 4.1 y se configura la reacción de acuerdo con el siguiente esquema:

Temperatura	Tiempo	Ciclos
94° C	2'	1
94° C	15''	30
52° C	30''	
68° C	2'	
68° C	5'	1
4° C	max. 8h	1

En la segunda reacción de PCR (PCR fusión) se utilizan, para cada mutante, 15 µl de los dos productos de PCR obtenidos en la reacción anterior. Se configura la reacción de acuerdo con el siguiente esquema:

Temperatura	Tiempo	Ciclos
94° C	2'	1
94° C	15''	20
68° C	2'	
68° C	5'	1
4° C	max. 8h	1

Después de cada reacción de PCR se purifican los fragmentos de acuerdo a lo indicado en el punto 4.9.

MATERIALES Y MÉTODOS

Virus	Nombre	Región de hibridación	Posición de hibridación / sentido	Descripción
LCMV	L4260R	Gen L	3520 / <i>R</i>	
	L3654F	Gen L	4083 / <i>F</i>	
	L4183F	Gen L	3597 / <i>F</i>	
	NP2699F	Gen NP	2699 / <i>F</i>	
	NP2743R	Gen NP	2743 / <i>R</i>	
	Z7F	Gen Z	95 / <i>F</i>	
	Z402R	IGR-L	490/ <i>R</i>	
	NP-BsmBI-Cter	Gen NP	1639 / <i>F</i>	Incorpora diana para <i>BsmBI</i> en el extremo 3'
	NP-BsmBI-Nter	Gen NP	3315 / <i>R</i>	Incorpora diana para <i>BsmBI</i> en el extremo 5'
	D382A-F	Gen NP	2169 / <i>F</i>	Introduce la mutación en la proteína NP D382A
	D382A-R	Gen NP	2169 / <i>R</i>	Introduce la mutación en la proteína NP D382A
	D459A-F	Gen NP	1938 / <i>F</i>	Introduce la mutación en la proteína NP D459A
	D459A-R	Gen NP	1938 / <i>R</i>	Introduce la mutación en la proteína NP D459A
	H517A-F	Gen NP	1764 / <i>F</i>	Introduce la mutación en la proteína NP H517A
	H517A-R	Gen NP	1764 / <i>R</i>	Introduce la mutación en la proteína NP H517A
	D522A-F	Gen NP	1749 / <i>F</i>	Introduce la mutación en la proteína NP D522A
	D522A-R	Gen NP	1749 / <i>R</i>	Introduce la mutación en la proteína NP D522A
	F387A-F	Gen NP	2154 / <i>F</i>	Introduce la mutación en la proteína NP F387A
	F387A-R	Gen NP	2154 / <i>R</i>	Introduce la mutación en la proteína NP F387A
	L452A-F	Gen NP	1959 / <i>F</i>	Introduce la mutación en la proteína NP L452A
	L452A-R	Gen NP	1959 / <i>R</i>	Introduce la mutación en la proteína NP L452A

LCMV	I514A-F	Gen NP	1773 / <i>F</i>	Introduce la mutación en la proteína NP I517A
	I514A-R	Gen NP	1773 / <i>R</i>	Introduce la mutación en la proteína NP I517A
	E527A-F	Gen NP	1734 / <i>F</i>	Introduce la mutación en la proteína NP E527A
	E527A-R	Gen NP	1734 / <i>R</i>	Introduce la mutación en la proteína NP E527A
VSV	L5902F	Gen L	5902 / <i>F</i>	
	L6569R	Gen L	6560 / <i>R</i>	
FMDV	3DR3	3D	6990 / <i>F</i>	
	AV3	3D	7370 / <i>R</i>	
EMCV	EM67D	3D	6718 / <i>F</i>	
	EM73R	3D	7343 / <i>R</i>	

Tabla 4.1. Oligonucleótidos empleados. *F*: Forward, *R*: Reverse.

4.9. Purificación de fragmentos de ADN amplificados por PCR

La purificación de los productos de PCR se realiza por extracción de gel de agarosa o bien por filtración, según el objetivo perseguido. En los casos en los que el fragmento se va a utilizar para clonar en un vector o para la obtención de un mutante por PCR la purificación se realiza por extracción de banda de un gel de agarosa. En el resto de los casos, los productos de PCR se purifican por filtración.

Para la purificación a partir de una banda de gel de agarosa se emplea el kit QIAquick Gel extraction kit (Qiagen), y se siguen las instrucciones del fabricante. El ADN purificado se cuantifica en un espectrofotómetro de amplio espectro (Nanodrop 1000). La purificación por filtración se realiza con el kit QIAquick PCR purification kit (Qiagen), y se siguen las instrucciones del fabricante.

4.10. Secuenciación de ADN

La secuenciación de nucleótidos se efectúa mediante técnicas de secuenciación automática en los secuenciadores ABI3730XL (Applied Biosystems). La reacción se realiza con el kit Big Dye Terminator V3.1 Cycle sequencing kit (Applied Biosystems). El análisis de las secuencias se lleva a cabo con el paquete DNASTar (Lasergene 9.0) mediante análisis de cromatogramas. Cada secuencia se verifica con la lectura en dos reacciones independientes y de sentido contrario. Los oligonucleótidos empleados se detallan en la Tabla 4.1. Los oligonucleótidos empleados para secuenciar el gen Z son Z7F y Z402R, y amplifican una región de 397 pares de bases. Los oligonucleótidos empleados para la secuenciación del fragmento del gen L son L3654F y L4260R, que amplifican una región de 560 pares de bases.

4.11. Cuantificación de moléculas de ARN viral por amplificación mediante PCR en tiempo real

La cuantificación de ARN viral se realiza en dos pasos; en primer lugar una retrotranscripción (ver punto 4.6) y en segundo, una PCR en tiempo real utilizando el termociclador LightCycler (Roche). Se utiliza el kit Light Cycler ADN Master SYBR Green I. La elaboración de la curva patrón para la determinación de la cantidad absoluta de moléculas de ARN se hace por transcripción *in vitro*, de manera que tanto las muestras problema como la curva patrón siguen exactamente el mismo proceso. Las parejas de oligonucleótidos empleadas son L4260R y L4183F (cuantificando el fragmento L) y NP2743R y NP2699F (cuantificando el fragmento S) (Tabla 4.1).

4.12. Clonaje molecular para el análisis genético de poblaciones de LCMV, EMCV, VSV y FMDV

Para asegurar que la amplificación por RT y PCR viral cuyo objetivo era el análisis de poblaciones virales no producen un cuello de botella que puede generar un sesgo en el análisis de la población de genomas virales estudiados, se realizan diluciones 1:10 y 1:100 de las muestras problema. Sólo si estas diluciones originan un producto de PCR positivo, la muestra sin diluir se emplea para el clonaje y análisis siguientes.

4.12.1. Clonaje en pGEM-T Easy

Para el análisis de cuasiespecies por secuenciación de clones moleculares, se clona el producto de PCR procedente de ARN viral en el vector comercial pGEM-T Easy (Promega). Si el vector de destino posee extremos no cohesivos, el producto de PCR (ver puntos 4.7 y 4.8) se somete a una reacción de incorporación de una A en cada extremo 3' del producto de PCR (tailing). La reacción incluye 5 µl de producto de PCR, 1 µl de tampón para la enzima GoTaq (Promega), 0.6 µl de $MgCl_2$ 25 mM, 2 µl de dATP y 1 µl de GoTaq (Promega). La mezcla se incuba a 70° C durante 40 minutos tras lo que se realiza una reacción de ligación con el vector pGEM-T Easy (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante.

4.12.2. Clonaje en pCR2.1

Para el manejo de fragmentos de ADN de manera estable y su posterior utilización en la obtención de clones infecciosos de LCMV por genética reversa se clonan fragmentos amplificados por PCR en el vector pCR2.1 (Invitrogen). Para ello se lleva a cabo una reacción de tailing (descrita en el apartado 4.12.1 de Materiales y métodos) como se ha indicado anteriormente

MATERIALES Y MÉTODOS

y se clona el fragmento en el vector por una reacción de ligación utilizando del vector pCR2.1.

4.12.3. Clonaje en pCAGGS ó pC-pol1

Para la realización de los ensayos de actividad cloranfenicol-acetil-transferasa (CAT) se clona el fragmento de PCR en un vector pCAGGS (BCCM). Para la expresión de componentes virales en células BHK-21, y obtención de virus infectivo a partir de plásmidos, se clona el producto de PCR en un vector pCAGGs (Flatz, L., et al, 2006) modificado en el que se ha insertado un promotor para la ARN polimerasa 1 celular (recuperación de virus procedentes de plásmidos). En la presente tesis doctoral, a este tipo de vectores basados en pCAGGS se les ha denominado pC-pol1. Para el clonaje en vectores pC-pol1 ó pCAGGS, se clona previamente el fragmento deseado en pCR2.1, el producto de la ligación se transforma en células competentes DH5 α y se recrecen según lo indicado en el apartado 4.13 de Materiales y métodos. El ADN purificado y el vector pC-pol1 se somete a una reacción de restricción empleando *Bsb1* ó *BsmB1* como enzimas de restricción, dependiendo del fragmento insertado. Se purifica el fragmento de interés de la restricción del vector pCR2.1 y se clona en el vector pC-pol1. El vector obtenido se transforma en células competentes DH5 α que se crecen y purifican según lo indicado en el apartado 4.13 de Materiales y métodos. Todos los plásmidos empleados se detallan en la Tabla 4.2.

4.13. Transformación y purificación de ADN

Para la transformación de vectores en células competentes, se descongelan 100 μ l de células DH5 α (mantenidas a -80°C para su almacenamiento) en hielo, y se incuban durante 30 minutos con 3-6 μ g de plásmido a transformar y a continuación se incuban en un baño a 42°C durante 30 segundos. Se

#	Nombre	Tipo Vector	Descripción
111	T7-MG- <i>iCAT</i>	pCAGGS	Incluye el promotor de la polimerasa de ARN de T7, que produce un ARNm codificante de la CAT en polaridad negativa
184	pC-Empty	pCAGGS	Sin inserto, vacío. Utilizado para compensar la carga en los controles negativos de transfecciones
295	pC-Cyt	pCAGGS	Incluye el promotor de expresión constitutiva codificante de la polimerasa de T7
312	Pol1-L	pC-Pol1	Produce el segmento L completo de LCMV
318	pC-L	pCAGGS	Codifica la polimerasa viral de LCMV (L)
332	pC-NP-HA	pCAGGS	Codifica la nucleoproteína de LCMV (NP) marcada con HA
364	pC-GFP	pCAGGS	Codifica la Green Fluorescent Protein (GFP)
376	Pol1-S	pC-Pol1	Produce un segmento S completo de LCMV
377	Pol1-S-GFP/NP	pC-Pol1	Produce un segmento S completo de LCMV con la sustitución del gen GPC por la GFP. Utilizado para la obtención de LCMVr3
384	Pol1-S-GPC/GFP	pC-Pol1	Produce un segmento S completo de LCMV con la sustitución del gen NP por la GFP. Utilizado para la obtención de LCMVr3
414	pC-NP	pCAGGS	Codifica la nucleoproteína de LCMV (NP)
683	Pol1-S-D459A	pC-Pol1	Vector #312 con la mutación D459A en la proteína NP
684	Pol1-S-H517A	pC-Pol1	Vector #312 con la mutación H517A en la proteína NP
685	Pol1-S-D522A	pC-Pol1	Vector #312 con la mutación D522A en la proteína NP

Tabla 4.2. Plásmidos empleados.

añaden 250 µl de medio SOC y se mantiene durante 60 minutos en agitación a 37°C. Las células se siembran en placas de LB-Agar con ampicilina 200 µg/ml y se deja crecer durante la noche. Las colonias obtenidas se crecen durante 24 horas en medio LB líquido en presencia de ampicilina (200 µg/ml) y el plásmido se purifica con el kit PureYield™ Plasmid Midiprep System (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante. El producto purificado se cuantifica por espectrofotómetro de amplio espectro (Nanodrop 1000).

4.14. Transfección de plásmidos

4.14.1. Transfección en células A549 y ensayo de *minigenoma*

Para los de ensayos de actividad CAT en los ensayos de *minigenoma*, se transfectan células A549 a una confluencia del 70% con los vectores deseados para cada experimento. El ensayo de *minigenoma* se fundamenta en que los dos factores esenciales para la transcripción en LCMV son NP y L (Lee, K. J. *et al.*, 2000) la una reacción colorimétrica (empleando el kit comercial CAT ELISA Kit; Roche); da un valor de actividad CAT que refleja la actividad transcripcional de la NP, lo que permite comparar NP carente de mutaciones (NP_{wt}) y NP mutantes (NP_{mut}). Para el ensayo de *minigenoma* se usan los plásmidos #318 (0.3 µg/pocillo), #414 (0.3 µg/pocillo) y #364 (0.5 µg/pocillo), que codifican las proteínas silvestres de LCMV. Para compensar la falta de los diferentes plásmidos en los controles negativos, se utiliza el plásmido #184 (Tabla 4.2). Adicionalmente, para el ensayo con virus portadores de mutaciones en la proteína NP se emplean, en lugar del plásmido #414, plásmidos codificantes de la proteína NP (0.5 µg/pocillo) con sustituciones puntuales en un vector pC-pol1 (pC_{mut}). Para la transfección se emplea Lipofectamine 2000 (en proporción 2.5 µl por cada µg de plásmido) y medio de cultivo Optimem (Gibco), hasta completar 1 ml, siguiendo las instrucciones del fabricante. La mezcla se incuba a temperatura ambiente 25 minutos y luego se añade a células A459 previamente sembradas para alcanzar una confluencia del 70% en el momento de la transfección, lavadas tres veces con medio Optimem, y se deja incubar 8 horas. Tras la incubación, se lava de nuevo tres veces con medio Optimem antes de añadir la mezcla preparada y se añade DMEMc con 10% de SFB durante 48-72 horas. A las 24 horas post-transfección se verifica la eficacia de la transfección observando al microscopio de fluorescencia células verdes (como consecuencia de la expresión de la GFP codificada por el plásmido #364). Se continua la incubación durante 48-72 horas.

4.14.2. Transfección en células BHK-21, BHK-21_{NP} y ensayo de recuperación de virus

Para el ensayo de recuperación de virus procedentes de plásmidos se realizan transfecciones en células BHK-21. En aquellos casos en los que se quiere verificar la complementación en los mutantes NP_{mut} por la proteína NP_{wt} o incrementar el título viral de mutantes para la NP, se emplean células BHK-21_{NP}.

Para el ensayo de recuperación de virus procedentes de plásmidos, en términos generales, se usan los plásmidos #376, #312, #318, #414 y #478 (Tabla 4.2). Para compensar la ausencia de los plásmidos, en los controles negativos, se utiliza el plásmido #184 (Tabla 4.2). Para obtener mutantes en la NP, se introducen las mutaciones deseadas en el plásmido #376. Se prepara una mezcla con los plásmidos empleados (#414, #318 y pC_{mut}: 0.3 µg de plásmido/pocillo; #364, #376 y #312: 0.5 µg de plásmido /pocillo), Lipofectamine 2000 (en proporción 2.5 µl por cada µg de plásmido) y medio de cultivo Optimem (hasta completar 1 ml) que se transfecta con células BHK-21 o BHK-21_{NP}. La mezcla se incuba a temperatura ambiente 25 minutos y luego se añade a células BHK-21 o BHK-21_{NP} previamente sembradas para alcanzar una confluencia del 70% en el momento de la transfección, lavadas tres veces con medio Optimem, y se deja incubar 8 horas. Tras la incubación, se lava de nuevo tres veces con medio Optimem antes de añadir la mezcla preparada y se añade DMEMc con 10% de SFB durante 48-72 horas. A las 24 horas post-transfección se verifica la eficacia de la transfección observando al microscopio de fluorescencia células verdes (como consecuencia de la expresión de la GFP codificada por el plásmido #364). A las 48-72 horas post-transfección se recoge el sobrenadante.

4.15. Cálculo de la entropía de Shannon normalizada y frecuencias de mutación máxima, mínima y específicas.

El efecto mutagénico de una droga para un virus se cuantifica mediante parámetros derivados de la comparación de secuencias encontradas en los espectros de mutantes. La frecuencia de mutación mínima ($F_{mut_{min}}$) es el número de mutaciones distintas (contando las repetidas una sola vez) encontradas en un conjunto de secuencias dividido por el número total de nucleótidos secuenciados (Domingo, E., 2007). La frecuencia de mutación máxima ($F_{mut_{max}}$) es el número total de mutaciones encontradas (independientemente de que estén repetidas) dividido por el número de nucleótidos secuenciados. La frecuencia de mutación específica es la frecuencia de mutación observada para un tipo de mutación (por ejemplo A→G), y se determina dividiendo el número de mutaciones específicas (únicas) entre el número de nucleótidos secuenciados. La suma de todas las frecuencias de mutación específicas de una población es equivalente a la $F_{mut_{min}}$ de dicha población.

La entropía de Shannon normalizada (S_n) es una medida de la similitud existente entre los diferentes genomas que constituyen un espectro de mutantes, tomando valores comprendidos entre 0 (homogeneidad completa) y 1 (heterogeneidad completa). La justificación teórica de este concepto se describe en (Volkenstein, M. V., 1994) y una aplicación al estudio de las cuasiespecies virales puede encontrarse en (Pawlotsky, J. M., 1998a; Pawlotsky, J. M. *et al.*, 1998b; Ruiz-Jarabo, C. M. *et al.*, 2000; Sierra, S. *et al.*, 2000; Airaksinen, A. *et al.*, 2003; Pariente, N. *et al.*, 2003; Sierra, M. *et al.*, 2007). La entropía de Shannon normalizada (S_n) se calcula a partir de la siguiente ecuación:

$$S_n = -[\sum_i (p_i \cdot \ln p_i)] / \ln N$$

en la que “ p_i ” es la frecuencia de cada secuencia en el conjunto de secuencias estudiado y “ N ” el número total de secuencias analizadas.

4.16. Disoluciones utilizadas

- Tripsina-EDTA: 0.5 mg/ml tripsina (Sigma), 0.016% etilendiaminotetracetato sódico (EDTA; Merck), 0.001% rojo fenol, diluidos en PBS.
- X-Gal: 5-Bromo-4-cloro-3-indolil- β -galactopiranosido (X-Gal, Roche) 2% en dimetilformamida (Merck).
- IPTG: isopropil- β -D-tiogalactopiranosido en agua destilada.
- PBS (solución salina tamponada con fosfato): 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.5 mM Na₂HPO₄, pH 6.8.
- TAE: 40 mM Tris acetato, pH 8.3, 1 mM EDTA.
- Solución bloqueante: 10% SFB en tampón de dilución
- Tampón de dilución: 3% albúmina de suero bovino, 0.3% TritonX-100 diluido en PBS.

RESULTADOS

“El esqueleto de la ciencia son los hechos, pero los músculos y los nervios son el significado que se les confiere, y el alma de la ciencia son las ideas”

Ruy Perez Tamayo (1924)
Científico mexicano

5. Resultados

5.1. Cinéticas de crecimiento de LCMV a distintas multiplicidades de infección (MdI)

Para comparar la cinética de producción de LCMV a distintas MdI, se realizaron infecciones con Arm53b en células BHK-21 a MdI de 0.01, 1 y 10 UFP/cél, recogiendo los sobrenadantes a las 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24 y 48 horas post-infección (hpi) (Figura 5.1).

A las 24 hpi, tanto a 10 UFP/cél como a 1 UFP/cél, la infección alcanza un título viral que se mantiene constante hasta el último tiempo analizado. En cambio, en la infección a 0.01 UFP/cél el título aumenta con el tiempo. El título a las 48 hpi es tanto menor cuanto mayor es la MdI ensayada. Estos resultados son coherentes con el fenómeno de autointerferencia (disminución

Resultados

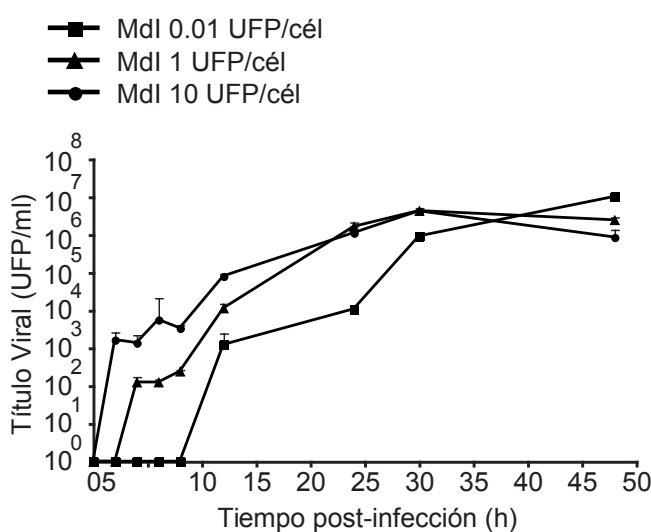


Figura 5.1. Cinética de crecimiento de LCMV en infecciones realizadas en células BHK-21 a MdI de 0.01, 1 y 10 UFP/cél. Las infecciones se realizaron tal y como se detalla en el apartado 4.4.1 de Materiales y métodos.

RESULTADOS

de la producción de progenie infecciosa debido a la generación de GDIs durante la infección) descrito previamente (Popescu, M. *et al.*, 1976; Dutko, F. J. *et al.*, 1983).

5.2. Cuantificación del ARN intracelular de los segmentos genómicos L y S en infecciones de LCMV a MdI de 0.01 y 10 UFP/cél

La acumulación intracelular del segmento genómico L de LCMV puede indicar una transición de una infección aguda a una de carácter persistente (Fuller-Pace, F. V. *et al.*, 1989). Asimismo, la acumulación intracelular de la proteína Z, codificada por el segmento genómico L, inhibe la replicación viral (Cornu, T. I. *et al.*, 2004; Capul, A. A. *et al.*, 2012). Para profundizar en las di-

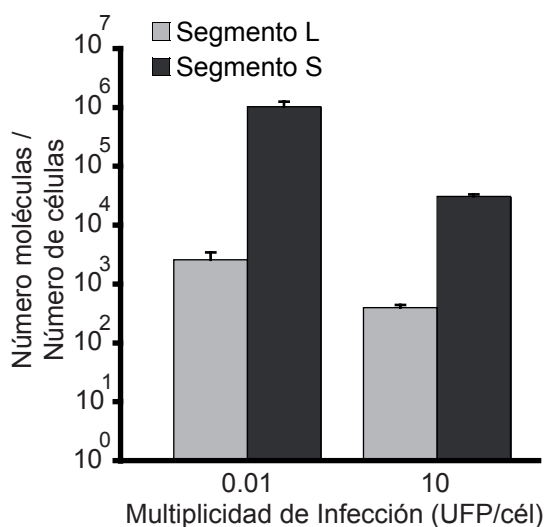


Figura 5.2. Relación entre el número de moléculas intracelulares de los segmentos genómicos L y S de LCMV y el número de células infectadas. Las infecciones, extracción del ARN viral, obtención de ADN complementario y su purificación se realizó de acuerdo a lo indicado en los apartados 4.4.1, 4.5, 4.6 y 4.9 de Materiales y métodos respectivamente.

ferencias en la naturaleza de una infección de LCMV a baja y alta MdI, y su posible relación con el carácter persistente o agudo de la infección, se cuantificaron las especies genómicas intracelulares tras 48 horas de infección de células BHK-21 a MdI de 0.01 y de 10 UFP/cél (Figura 5.2). Para la cuantificación se utilizaron dos parejas de oligonucleótidos específicos para LCMV (Tabla 4.1), una que amplifica un fragmento del gen NP (segmento S; NP2699F y NP2743R) y otra que amplifica un fragmento del gen L (segmento L; L4260R y L4183F). En infecciones realiza-

das a MdI de 0.01 UFP/cél, la cantidad de S fue 395 veces superior a la determinada para el segmento L, mientras que en infecciones realizadas a MdI de 10 UFP/cél, esta relación era de 78 veces.

Los resultados obtenidos sugieren que en infecciones a MdI menores se detecta una menor cantidad del segmento genómico L que en infecciones a MdI superiores, lo que está de acuerdo con que a baja MdI se atenúa el efecto de la interferencia y se facilita la infección aguda a pesar de que en nuestras condiciones experimentales no se observa efecto citopático en las células BHK-21.

5.3. Efecto del 5-fluorouracilo en distintos virus a distintas MdI

5.3.1. Efecto del 5-fluorouracilo sobre el título de LCMV a distintas MdI

El FU es mutagénico para LCMV e incrementa la complejidad del espectro de mutantes, produciendo además, una fuerte reducción del título viral que no se correlaciona con una bajada proporcional de la cantidad de ARN viral (Grande-Pérez, A. *et al.*, 2002; Ruiz-Jarabo, C. M. *et al.*, 2003; de la Torre, J. C., 2005; Grande-Pérez, A. *et al.*, 2005a; Grande-Pérez, A. *et al.*, 2005b; Martín, V. *et al.*, 2008; Martín, V. *et al.*, 2010). Esta última observación propició la formulación del modelo de defección letal (Ver apartado 2.3.2 de Introducción).

Para investigar el efecto de la MdI en la inhibición de la producción de LCMV por FU, se llevaron a cabo infecciones de células BHK-21 con LCMV Arm53b a MdI comprendidas entre 0.001 y 10 UFP/cél en ausencia y presencia de FU (20, 35 y 50 µg/ml). Los sobrenadantes se recogieron a las 48 hpi y se titularon tal y como se detalla en Materiales y métodos (Figura 5.3.1). Los resultados indican que la inhibición ejercida por el FU sobre la producción de LCMV infeccioso es tanto menor cuanto mayor es la MdI y es proporcional

RESULTADOS

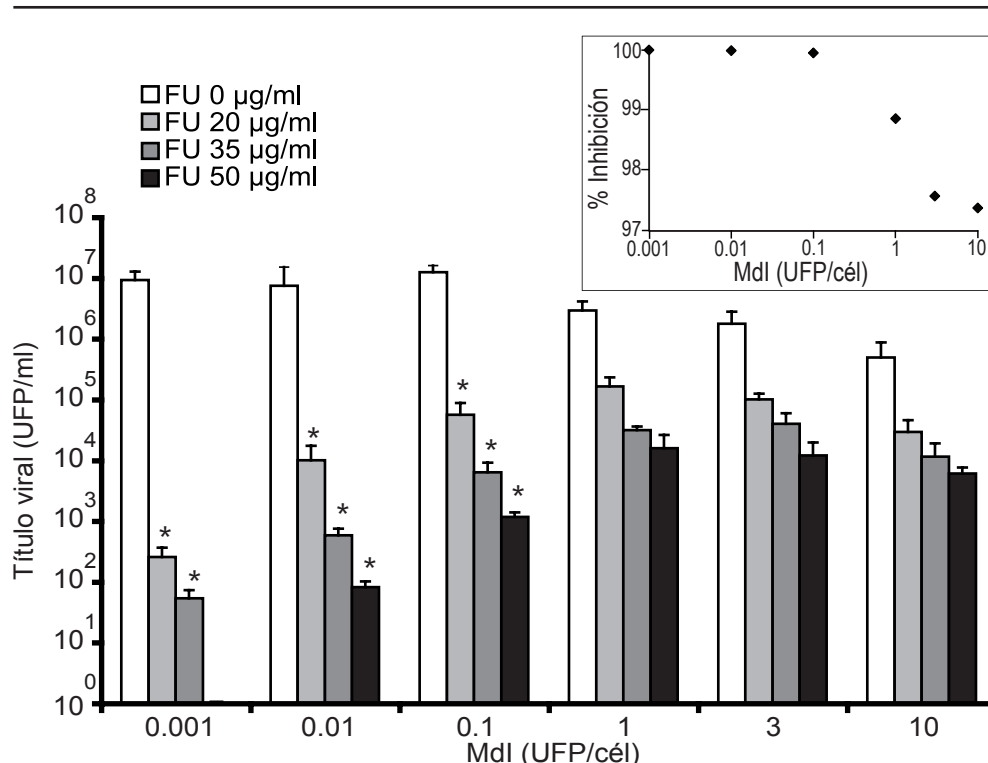


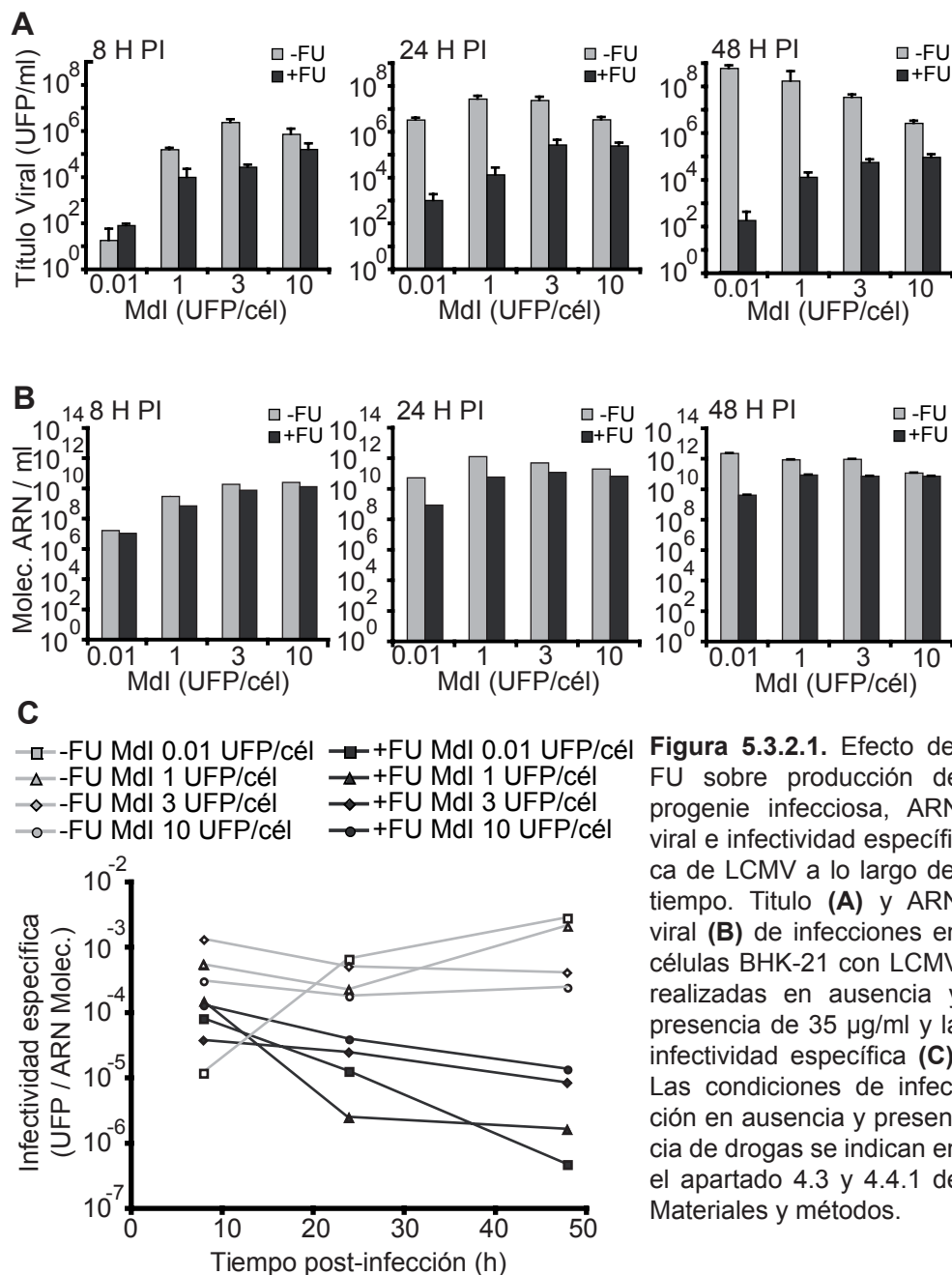
Figura 5.3.1. Infecciones realizadas con LCMV en células BHK-21 a Mdl comprendidas entre 0.001 y 10 UFP/cél en ausencia y presencia de FU (20, 35 y 50 µg/ml). Los asteriscos (*) indican diferencias significativas (t-test de pares con corrección de Bonferroni, $p < 0.05$) en la inhibición ejercida por el FU comparadas con la inhibición ejercida en infecciones a Mdl de 10 UFP/cél. En el panel de arriba a la derecha se resumen los valores de inhibición en función de la Mdl. Las condiciones de infección en ausencia y presencia de drogas se indican en el apartado 4.3 y 4.4.1 de Materiales y métodos.

a la concentración de la droga. También se observa de nuevo (Punto 5.1) una disminución del título viral de LCMV en ausencia de FU a Mdl de 1 UFP/cél y superiores, consistente con el fenómeno de autointerferencia (Welsh, R. M. *et al.*, 1972; Popescu, M. *et al.*, 1976; Dutko, F. J. *et al.*, 1983). La diferencia entre la inhibición ejercida por el FU a Mdl de 10 UFP/cél y a Mdl iguales o inferiores a 1 UFP/cél es estadísticamente significativa (t-test de pares con corrección de Bonferroni, $p < 0.05$; diferencias significativas indicadas con asteriscos (*) en la Figura 5.3.1).

5.3.2. Titulación, cuantificación de ARN viral e infectividad específica de LCMV en ausencia y presencia de 5-fluorouracilo, a diferentes tiempos y MdI.

Para evaluar el efecto del FU sobre la producción de LCMV en función del tiempo, se realizaron infecciones en células BHK-21 a MdI de 0.01, 1, 3 y 10 UFP/cél en ausencia y presencia de 35 µg/ml de FU (concentración de droga que permitía la determinación del título viral, por encima del límite de detección, a cualquier MdI ensayada) y se tomaron muestras de los sobrenadantes a 8, 24 y 48 hpi. Las muestras se titularon (Figura 5.3.2.1A), se cuantificó la cantidad de ARN viral (Figura 5.3.2.1B) y se calculó la infectividad específica (Figura 5.3.2.1C). Se estudió una posible correlación entre el logaritmo de la MdI y el porcentaje de inhibición ejercido por el FU sobre el título y el ARN viral. Los resultados (Figura 5.3.2.2) indican que el FU ejerce una inhibición tanto mayor cuanto menor es la MdI ensayada. La inhibición ejercida por el FU sobre el título viral se hace más patente con el paso del tiempo y en consecuencia, el valor de la R² de las rectas de regresión aumenta a tiempos tardíos (5.3.2.2A). La variación en las cantidades de ARN viral (5.3.2.2B) es comparable a la del título viral, aunque más atenuada. En infecciones a MdI de 0.01 UFP/cél, la infectividad específica a las 48 hpi fue más de 7500 veces superior en ausencia de FU que en presencia de la droga. En infecciones a MdI de 10 UFP/cél, la infectividad específica fue 17 veces superior en ausencia de FU a la calculada en presencia de la droga. Las diferencias observadas, tanto en título como en cantidad de ARN viral, aumentan con el tiempo. Los resultados sugieren que en condiciones de baja MdI en las que la autointerferencia es limitada, la acción mutagénica del FU adquiere mayor relevancia en la producción de GDIs, en apoyo del modelo de extinción viral por defección letal por mutagénesis incrementada (Grande-Pérez, A. *et al.*, 2005b).

RESULTADOS



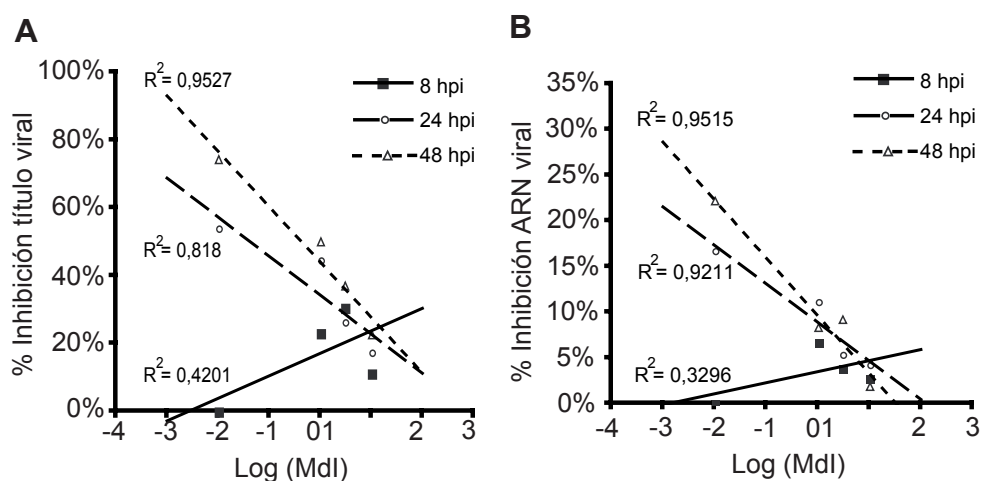


Figura 5.3.2.2. Inhibición ejercida por el FU sobre la producción de progenie infecciosa de LCMV **(A)** y de ARN viral **(B)** en función de la Mdl en infecciones de células BHK-21 medidas a distintos tiempos post-infección.

5.3.3. Análisis genético de las poblaciones de LCMV producidas a baja y alta Mdl, en ausencia y presencia de 5-fluorouracilo

Para evaluar si las diferencias en el grado de inhibición ejercida por el FU se asociaban a la complejidad de la cuasiespecies, se realizó un análisis de los genes Z y L de las poblaciones obtenidas en ausencia y presencia de 35 $\mu\text{g/ml}$ de FU a Mdl 0.01 y 10 UFP/cél (Figura 5.3.3.1). Las diferencias en frecuencia de mutación mínima entre poblaciones no tratadas y tratadas con FU resultaron siempre significativas ($p < 10^{-4}$ para infecciones a Mdl de 0.01 UFP/cél; $p = 0.02$ para infecciones a Mdl de 10 UFP/cél; χ^2 test). El incremento tanto en los valores de frecuencia de mutación (de 1.8 a 2.4 veces), como de la entropía de Shannon normalizada (1.6 a 6.4 veces) debido a la presencia del FU, fueron siempre mayores en infecciones a Mdl 0.01 UFP/cél que en Mdl 10 UFP/cél. En todos los casos, el descenso de la infectividad estuvo acompañado de un incremento en la complejidad de la cuasiespecies (Figuras 5.3.2.1 y 5.3.3.1), sugiriendo que la variación en ambos parámetros es propiciada por la producción de GDIs.

RESULTADOS

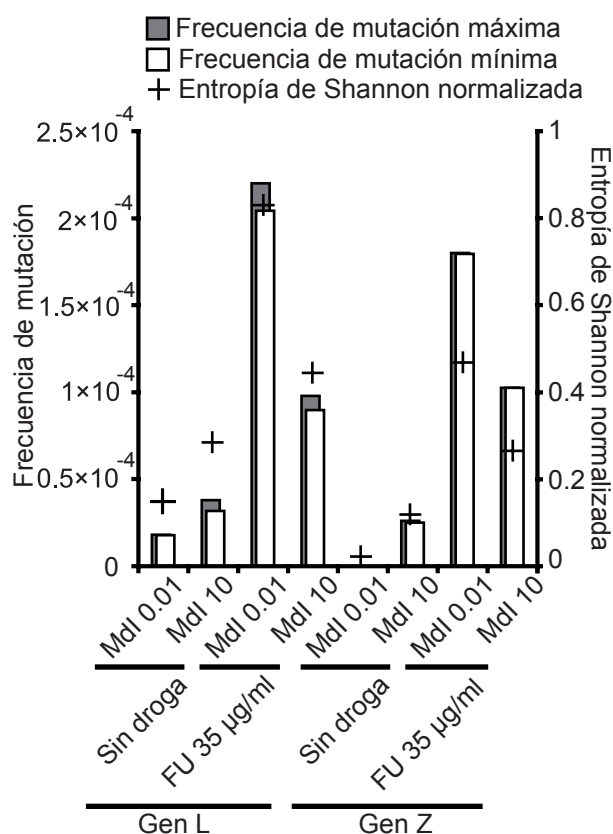


Figura 5.3.3.1. Complejidad de las cuasiespecies de LCMV resultantes de infecciones de células BHK-21 en ausencia y presencia de 35 µg/ml de FU a MdI de 0.01 y 10 UFP/cél. Las frecuencias de mutación y entropía de Shannon normalizada se determinaron para las regiones de los genes L y Z de acuerdo a lo descrito en el apartado 4.15 de Materiales y métodos.

Aunque en conjunto (genes L y Z) todas las mutaciones observadas coinciden con el patrón de mutaciones típicamente producido por el FU previamente observado (A→G y U→C), el tipo de transiciones observadas en los genes L y Z resultaron diferentes. En el gen L, las transiciones predominantes fueron A→G, mientras que en el gen Z fueron U→C. Las diferencias en las frecuencias de mutación específicas (A→G frente a U→C) entre ambos genes resultaron estadísticamente significativas ($p < 10^{-4}$, χ^2 test) (Figura 5.3.3.2), aunque las bases moleculares de esta diferencia se desconocen.

Las diferencias observadas en producción viral en ausencia y presencia de FU son proporcionales a la complejidad de la cuasiespecies. El incremento producido por la presencia de FU en la complejidad del espectro de mutantes fue siempre mayor en infecciones a MdI de 0.01 que a 10 UFP/cél.

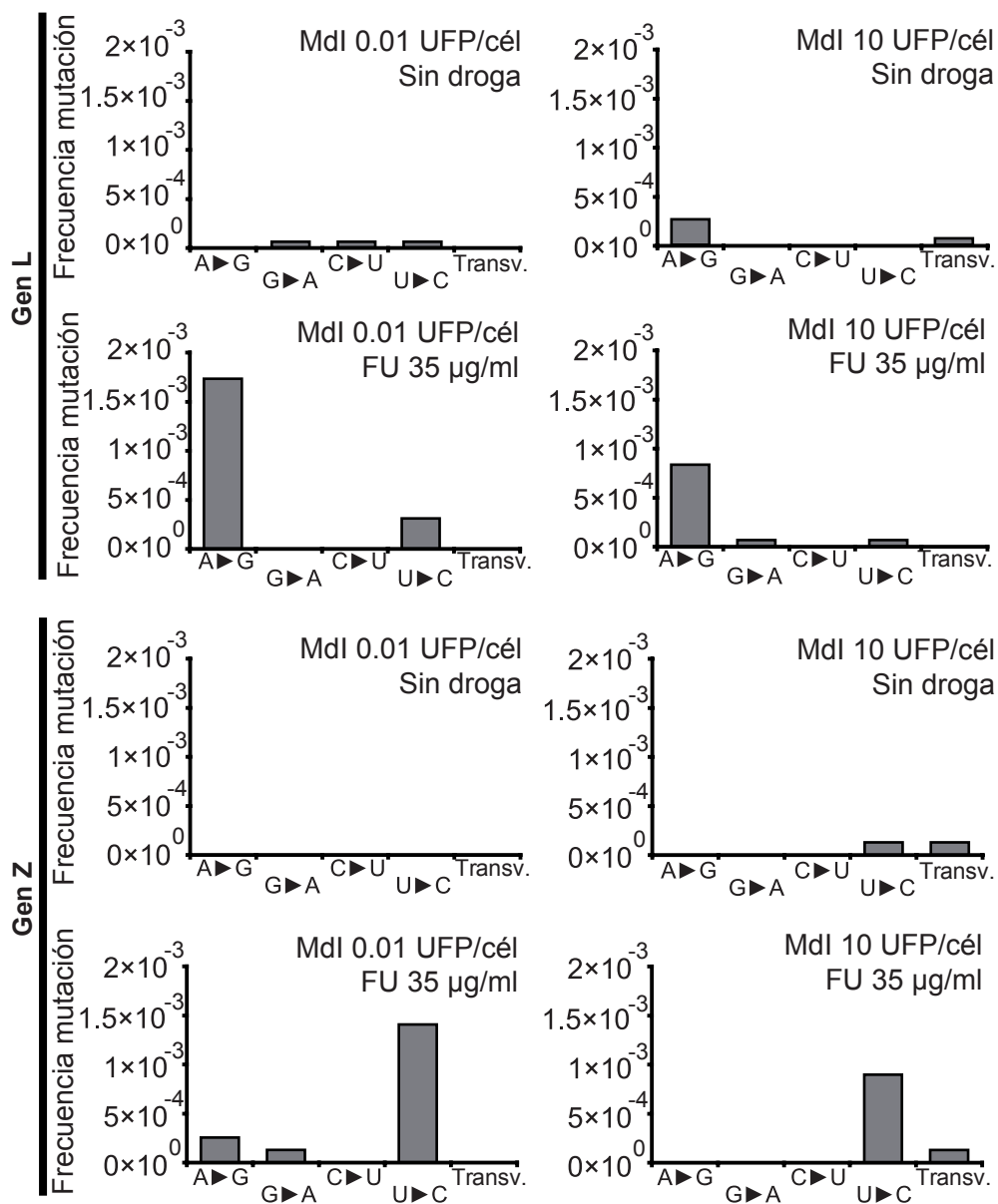


Figura 5.3.3.2. Frecuencias de mutación específicas para cada tipo de transición observadas en las cuasiespecies de LCMV obtenidas en ausencia y presencia de 35 µg/ml de FU a Mdl de 0.01 y 10 UFP/cél en células BHK-21. Las frecuencias de mutación específicas se determinaron de acuerdo a lo descrito en el apartado 4.15 de Materiales y métodos. Transv.: Transversiones totales.

RESULTADOS

5.3.4. Efecto del 5-fluorouracilo en infecciones con EMCV, VSV y FMDV a distintas MdI

Para estudiar si el efecto de la MdI y del FU sobre la producción viral observado en LCMV es común a otros virus, se realizaron experimentos con VSV, EMCV y FMDV. Se infectaron células BHK-21 en ausencia y presencia de FU (20, 35 y 50 $\mu\text{g/ml}$ para VSV y 100, 200 y 400 $\mu\text{g/ml}$ para EMCV y FMDV) a MdI comprendidas entre 0.001 y 10 UFP/cél, y se recogió el sobrenadante a las 24 hpi (tiempo al que el efecto citopático era completo en las infecciones en ausencia de droga) (Figura 5.3.4). Las concentraciones de FU empleadas en las infecciones de EMCV y FMDV fueron superiores a las empleadas en VSV dada la menor sensibilidad de estos picornavirus al FU (Sierra, S. *et al.*, 2000; Agudo, R. *et al.*, 2008; Agudo, R. *et al.*, 2009).

En todos los casos, la inhibición de la producción de progenie infecciosa fue proporcional a la concentración de FU empleada, tal y como es de esperar. En las infecciones con VSV, se observa un fenómeno análogo al observado con LCMV, en el que la inhibición ejercida por el FU guarda una correlación negativa con la MdI ensayada. En VSV las diferencias la inhibición ejercida por el FU son siempre significativas al comparar infecciones a MdI 0.001 UFP/cél con MdI superiores (Figura 5.3.4; t-test de pares con corrección de Bonferroni, $p < 0.05$). En las infecciones con EMCV y FMDV, la inhibición ejercida por el FU no se correlaciona de manera clara con la MdI ensayada, y las diferencias en la inhibición ejercida por el FU entre las infecciones a MdI de 0.001 UFP/cél y las realizadas a MdI superiores sólo resultan significativas en los casos marcados con un asterisco (*) (t-test de pares con corrección de Bonferroni, $p > 0.05$) (Figura 5.3.4).

Contrariamente a los resultados obtenidos con LCMV y VSV, en las infecciones con EMCV y FMDV no se observó ninguna correlación clara entre la inhibición ejercida por el FU y la MdI ensayada. Por tanto la correlación negativa entre la inhibición de la producción viral por el FU y la MdI no es un

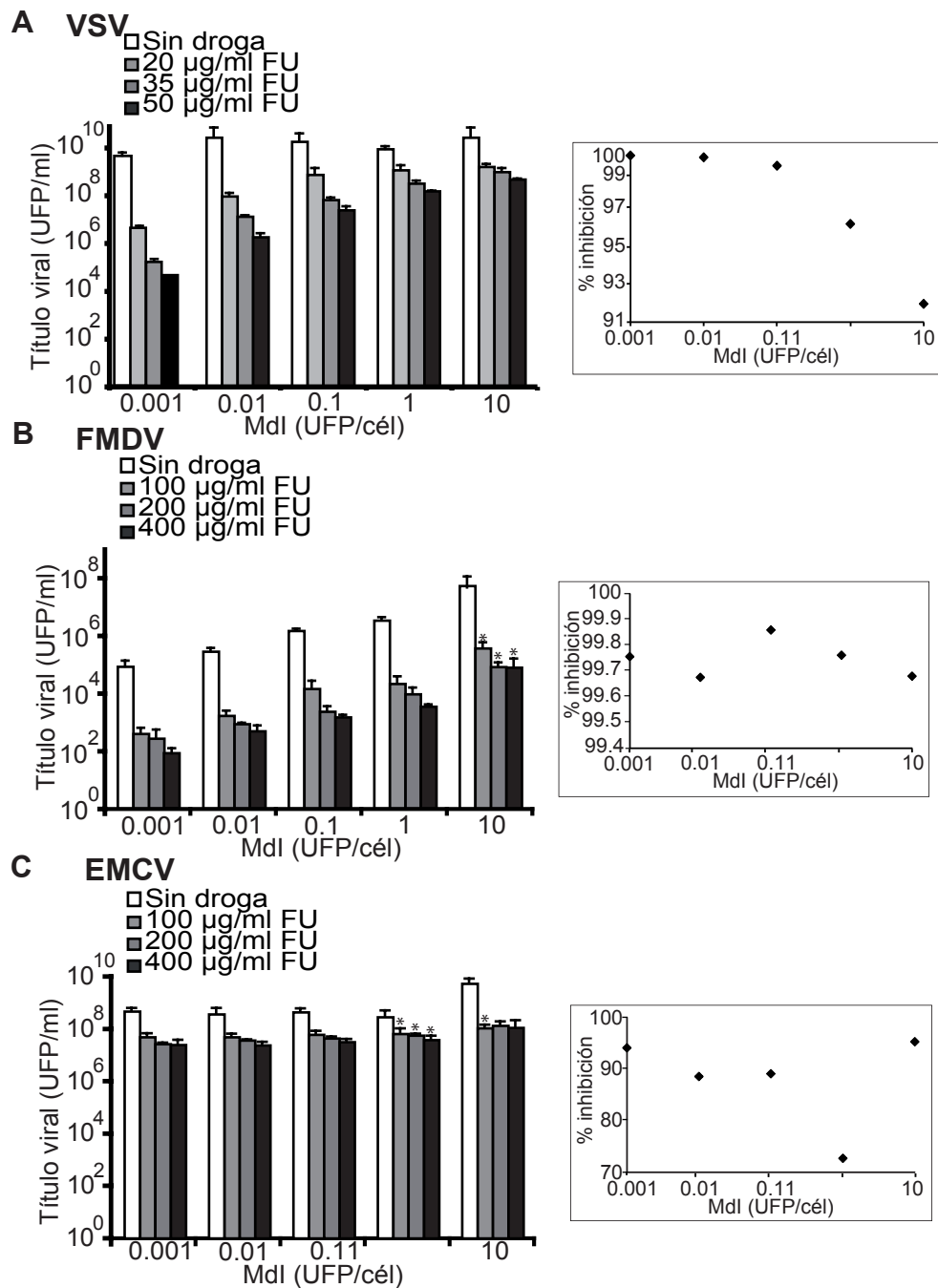


Figura 5.3.4. Infección de células BHK-21 con VSV (A), FMDV (B) y EMCV (C) en ausencia y presencia de FU a Mdl comprendidas entre 0.001 y 10 UFP/cél en células BHK-21. Las concentraciones de FU se indican en cada caso. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas en la inhibición ejercida por el FU respecto a la observada en las infecciones a Mdl de 0.001 UFP/cél (t-test de pares con corrección de Bonferroni, $p < 0.05$). En los paneles de la derecha se resumen los valores de la inhibición en función de la Mdl. Las condiciones de infección se indican en el apartado 4.3 y 4.4.1 de Materiales y métodos.

RESULTADOS

fenómeno general para todos los virus de ARN, ya que se puede observar en VSV y LCMV pero no en EMCV ni en FMDV. Los resultados sugieren que la escasa tendencia de los Picornavirus a producir GDIs, incluso a alta MdI, puede estar implicada en la diferencia observada.

5.3.5. Influencia de la mutagénesis previa en EMCV sobre el efecto del 5-fluorouracilo a baja y alta MdI

Para profundizar en la naturaleza de las diferencias observadas entre los diferentes virus empleados, se realizaron 20 pases seriados infectando células BHK-21 con EMCV en ausencia y presencia de 800 μ M de Rib. Cada pase se realizó con 500 μ l (10% del volumen total) del sobrenadante del pase anterior. Tras los pases, se infectaron células BHK-21 en ausencia y presencia de FU (100, 200 y 400 μ g/ml) utilizando los pases número 20 de las infecciones en ausencia y presencia de Rib (Figura 5.3.5). Tanto para el pase 20 en ausencia como en presencia de Rib, las diferencias en la inhibición ejercida por el FU a MdI de 0.001 y de 10 UFP/cél resultaron estadísticamente significativas (t-test de pares con corrección de Bonferroni, $p > 0.05$) en los casos indicados con asteriscos en la Figura 5.3.5. Estos resultados indican que la propagación del EMCV en cultivos celulares confieren al virus una sensibilidad al FU dependiente de MdI. Esta dependencia adquirida ilustra que el comportamiento de una población viral respecto a las condiciones de infección puede estar condicionada por la historia previa de la población.

5.3.6. Análisis genético de las poblaciones de EMCV, VSV y FMDV a baja y alta MdI en ausencia y presencia de 5-fluorouracilo

Para analizar el efecto mutagénico ejercido por el FU sobre los diferentes virus estudiados se determinó la complejidad de las cuasiespecies resultantes de infecciones a MdI de 0.01 y 10 UFP/cél, en ausencia y presencia

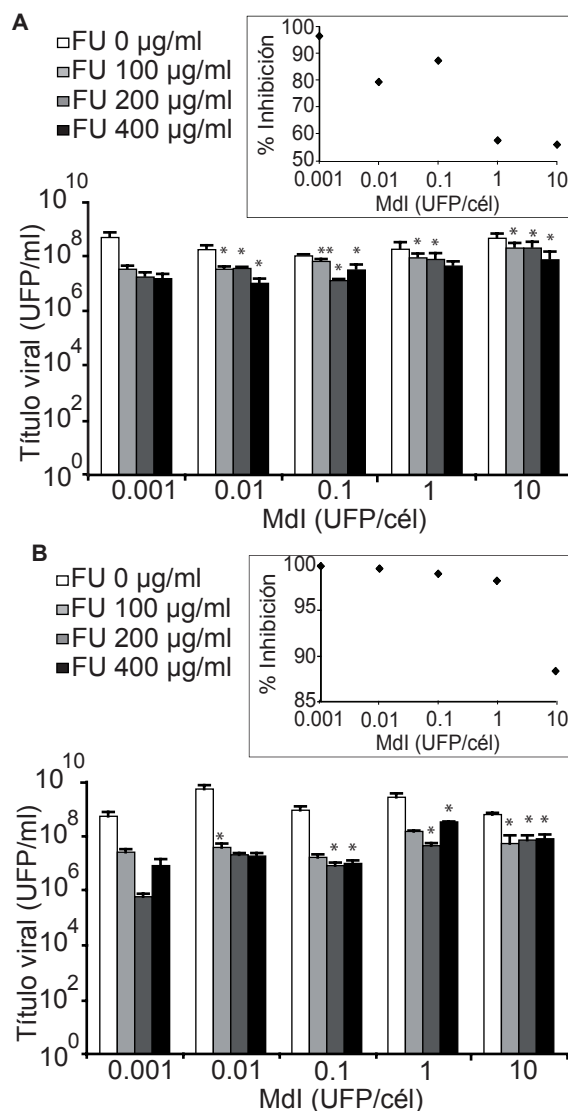


Figura 5.3.5. Efecto de pases seriados previos en ausencia **(A)** y presencia **(B)** de 800 µM de Rib en el efecto de la inhibición del FU en función de la Mdl en EMCV. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas (t-test de pares con corrección de Bonferroni, $p > 0.05$) en la inhibición ejercida por el FU respecto a las infecciones realizadas a Mdl de 0.001 UFP/cél. En los paneles a la derecha se resumen los valores de la inhibición de la Mdl. Las condiciones de infección en los apartados 4.3 y 4.4.1 de Materiales y métodos.

de FU, para VSV, EMCV y FMDV. Para ello se analizaron las secuencias (fragmentos de los genes 3D para EMCV y FMDV y L para VSV) de las poblaciones obtenidas a baja Mdl (0.01 UFP/cél para VSV y 0.001 UFP/cél para EMCV y FMDV) y alta (10 UFP/cél en todos los casos) en ausencia y presencia de FU (35 µg/ml para VSV y 200 µg/ml para EMCV y FMDV) a las 24 hpi (Figura 5.3.6).

En todos los casos la frecuencia de mutación y la entropía de Shannon normalizada resultaron superiores en las poblaciones tratadas con FU que en las poblaciones pasadas en ausencia de la droga ($p < 0.05$, test χ^2). En las poblaciones de VSV se observó un aumento en la frecuencia de mutación y entropía de Shannon normalizada en las cuasiespecies obtenidas a Mdl menor que, aunque no alcanzan niveles significativos ($p > 0.05$, test χ^2); siguen la

RESULTADOS

- Frecuencia de mutación máxima
- Frecuencia de mutación mínima
- + Entropía de Shannon normalizada

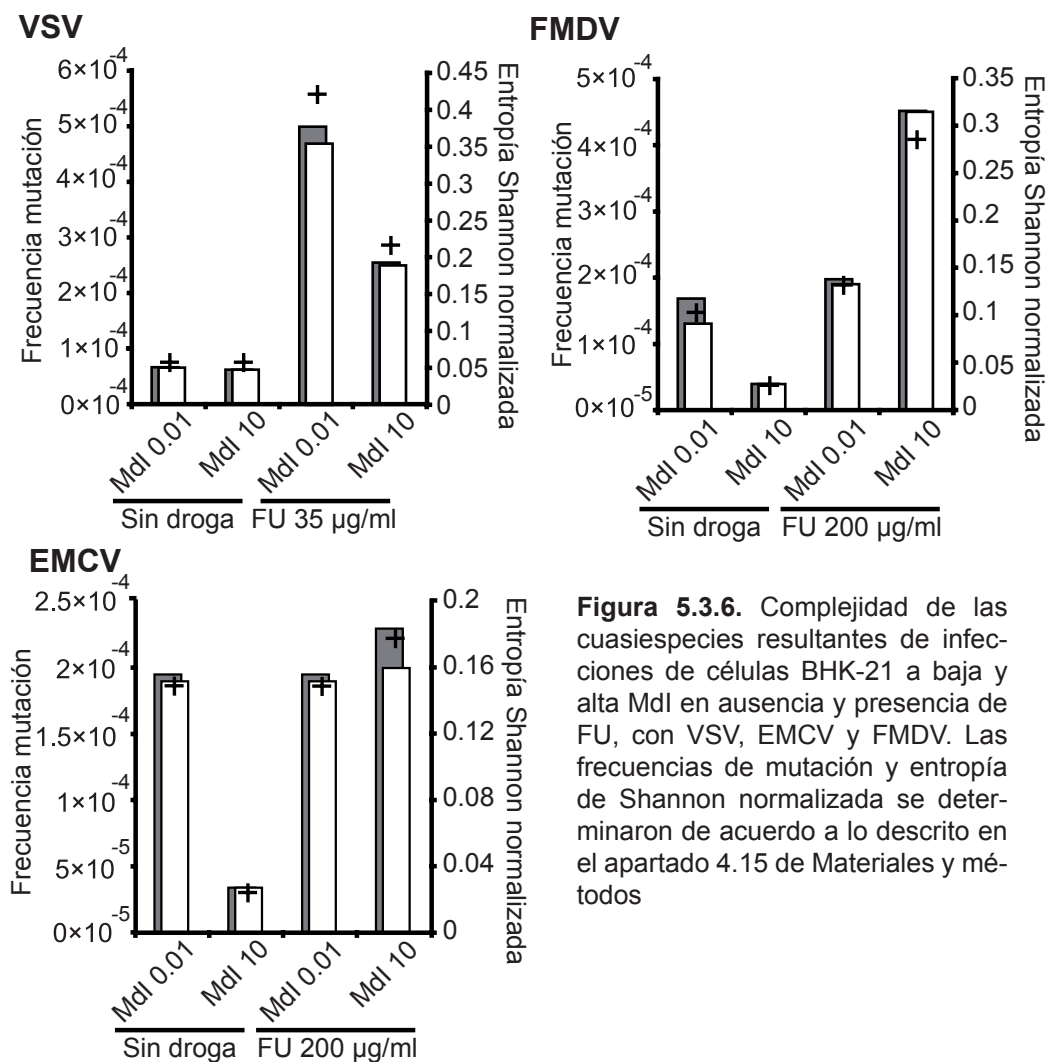


Figura 5.3.6. Complejidad de las cuasiespecies resultantes de infecciones de células BHK-21 a baja y alta Mdl en ausencia y presencia de FU, con VSV, EMCV y FMDV. Las frecuencias de mutación y entropía de Shannon normalizada se determinaron de acuerdo a lo descrito en el apartado 4.15 de Materiales y métodos

misma tendencia que la observada en LCMV. En presencia de FU, FMDV y EMCV presentan una mayor complejidad en la cuasiespecies a Mdl de 10 UFP/cél que a Mdl de 0.001 UFP/cél, contrariamente a lo observado en LCMV y VSV (Figura 5.3.6), aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas.

De modo análogo a lo observado en LCMV, VSV se correlaciona la inhibición ejercida por el FU sobre la producción de progenie viral con un aumento de la complejidad del espectro de mutantes. Por el contrario, EMCV y FMDV no se comportan de este modo.

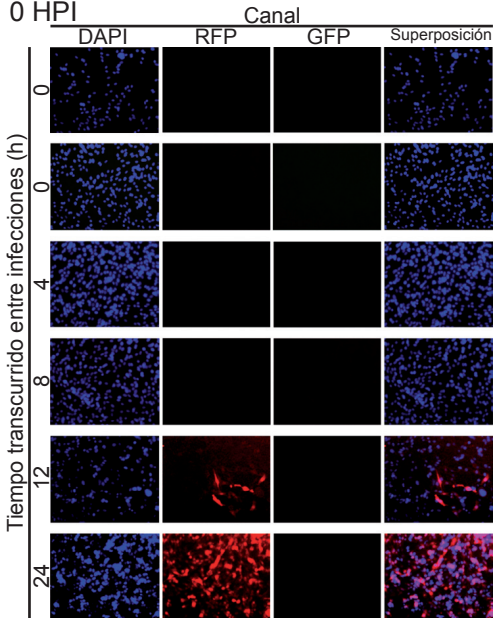
5.4. Exclusión de reinfección por LCMV en células BHK-21

Se conoce como exclusión de reinfección al fenómeno por el que la infección de un virus impide o dificulta infecciones siguientes con el mismo o con otros virus (exclusión de reinfección homóloga o no homóloga, respectivamente). La interferencia se ha atribuido a la presencia o generación de GDIs que se localizan en la misma célula, bien sea porque se han generado en ella, o bien porque la han reinfectado (Ojosnegros, S. *et al.*, 2010; Easton, A. J. *et al.*, 2011; Moreno, H. *et al.*, 2012). Dada la relevancia de la exclusión de reinfección para la intensidad de la defeción letal en virus, se investigó este fenómeno en LCMV. Para ello, se infectaron células BHK-21 (infección primaria) con 3rLCMV/RFP a MdI de 0.001, 0.01, 0.1, 1, y 10 UFP/cél; este virus marcaría de rojo las células infectadas (ver apartado 4.4.1 de Materiales y métodos). A continuación, se realizó una segunda infección (infección secundaria) con 3rLCMV/GFP a una MdI de 0.1 UFP/cél tras 0, 4, 8, 12 ó 24 horas tras la infección primaria; este virus marcaría de verde las células infectadas. Se analizó la distribución de los marcadores a las 0 y 48 horas tras la infección secundaria (Figura 5.4). Los resultados indican que LCMV presenta una fuerte exclusión de reinfección (homóloga), de manera que infecciones primarias impiden reinfecciones secundarias con el mismo virus transcurridas, como máximo, 8 hpi. En infecciones realizadas a MdI inferiores o iguales a 0.1 UFP/cél las primeras células infectadas (en rojo) pueden observarse a partir de las 12 hpi. En infecciones realizadas a MdI de 1 ó 10 UFP/cél, las primeras células infectadas pueden observarse a partir de las 8 hpi. En las infecciones a MdI de 10 UFP/cél, no se observan células infectadas por la in-

RESULTADOS

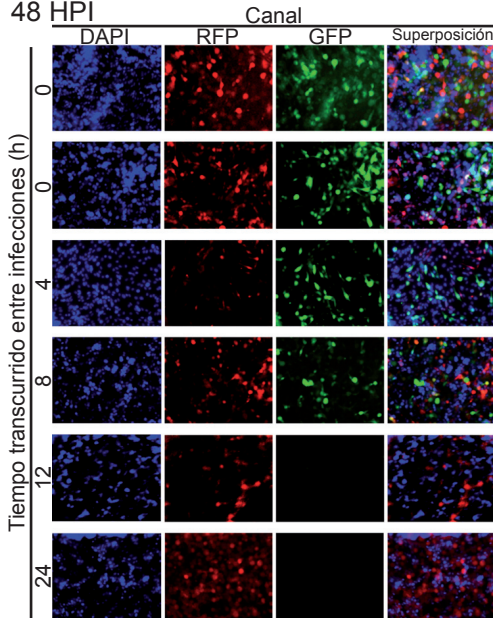
A

MdI 0.001 UFP/cél
0 HPI



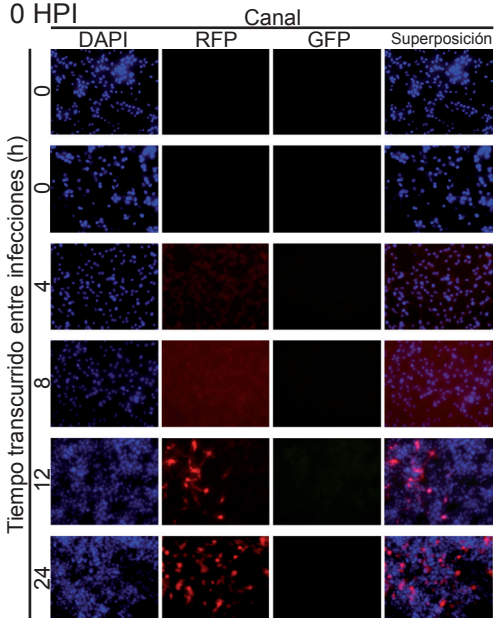
B

MdI 0.001 UFP/cél
48 HPI



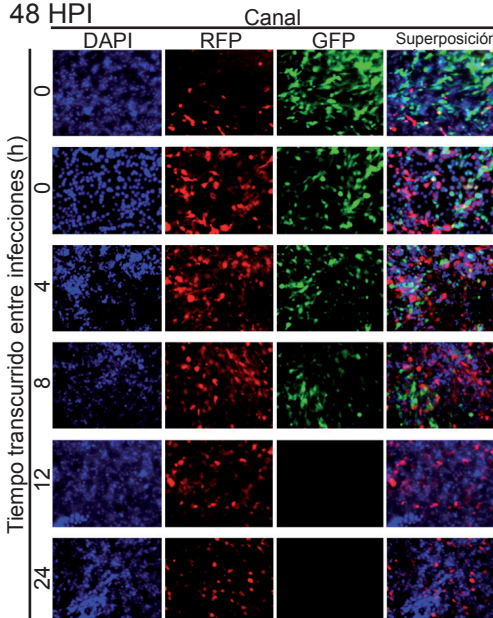
C

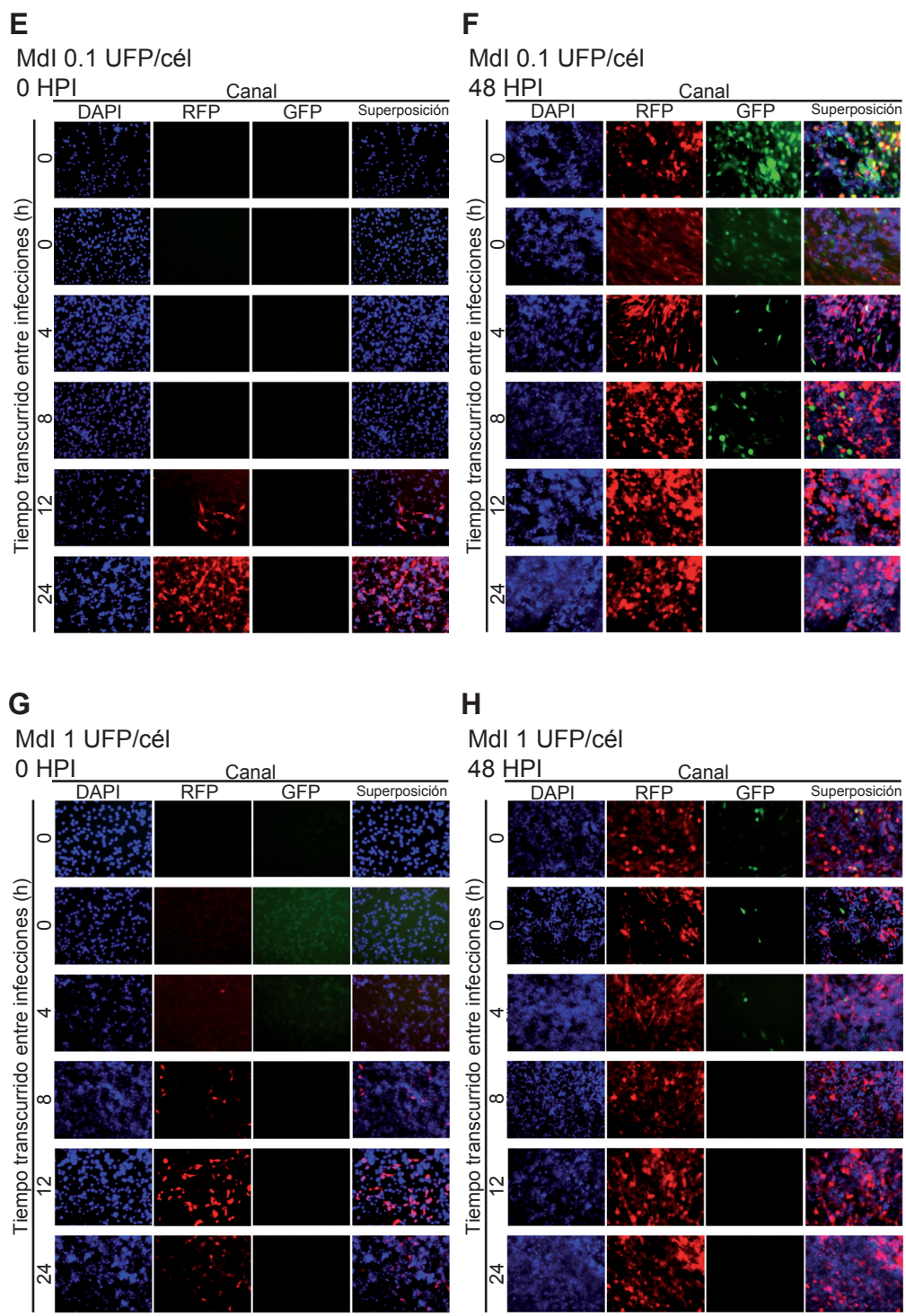
MdI 0.01 UFP/cél
0 HPI



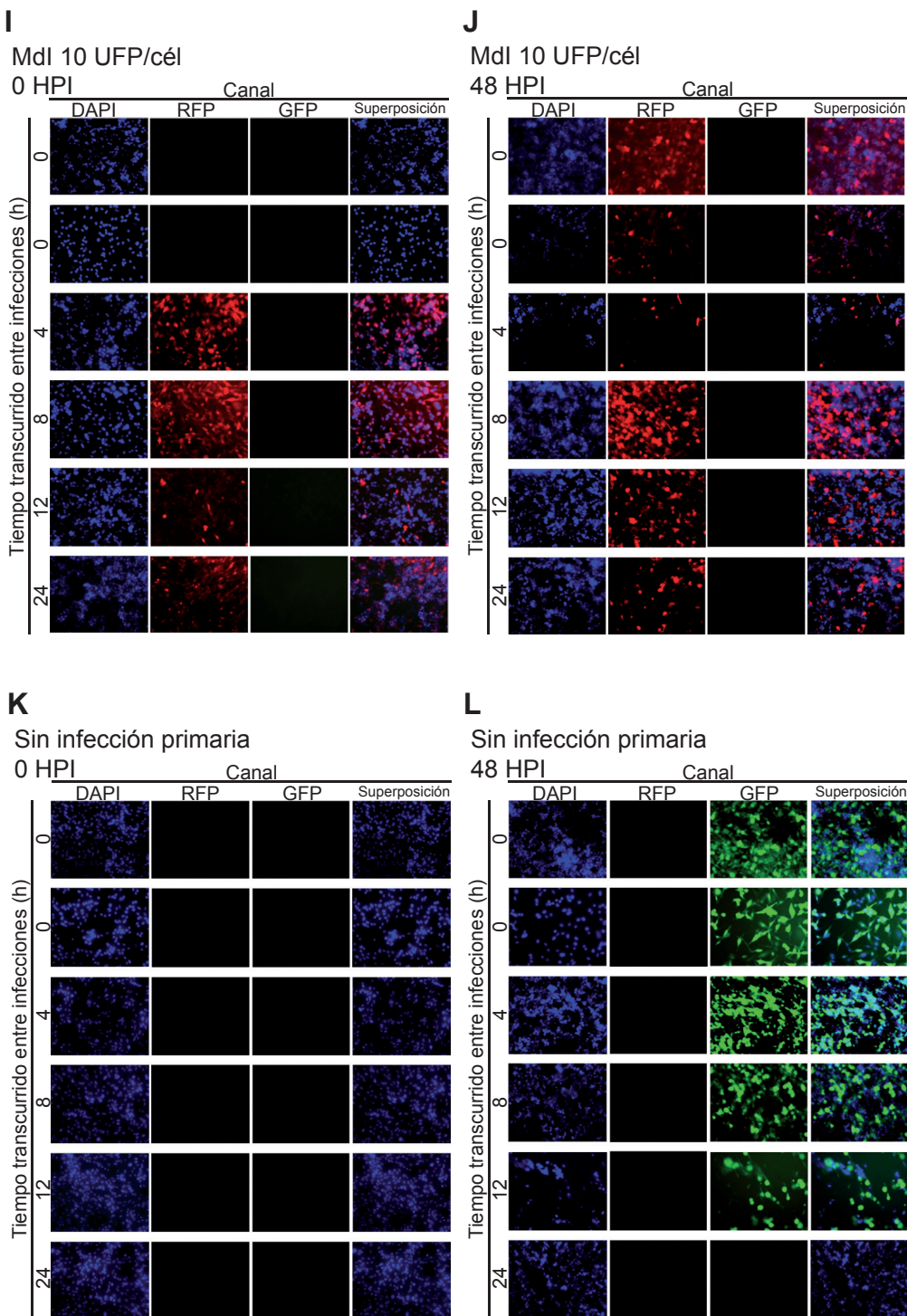
D

MdI 0.01 UFP/cél
48 HPI





RESULTADOS



[Páginas anteriores] Figura 5.4. Infecciones primarias en células BHK-21 con 3rLCMV/RFP a Mdl de 0.001 (paneles A y B), 0.01 (paneles C y D), 0.1 (paneles E y F), 1 (paneles G y H) y 10 (paneles J y K) UFP/cél y reinfecciones con 3rLCMV/GFP a Mdl de 0.1 UFP/cél pasadas 0, 4, 8, 12 ó 24 hpi desde la infección primaria. Las fotografías se tomaron pasadas 0 y 48 hpi desde la infección secundaria. Las condiciones de infección se indican en el apartado 4.4.1 de Materiales y métodos

fección secundaria, independientemente del tiempo transcurrido entre ambas infecciones. En las infecciones realizadas a MdI inferiores sólo se observaron células infectadas por 3rLCMV/GFP cuando el tiempo entre infecciones era inferior a 12 horas. Tras 48 horas desde la infección secundaria, en los casos de 0 horas entre las infecciones primaria y secundaria, a MdI iguales o inferiores, se observaron células amarillas resultantes de la coinfección (0 horas entre infecciones) de los dos virus utilizados (3rLCMV/GFP y 3rLCMV/RFP) (Figura 5.4). Estos datos son coherentes con los resultados obtenidos en las cinéticas de crecimiento descritas en el apartado 5.1 de Resultados.

Dada la exclusión de reinfección observada, las interacciones (interferencia y complementación) entre genomas de las cuasiespecies de LCMV, deben producirse entre genomas que coinfecten la misma célula (o cuyas infecciones no estén separadas más de 12 horas) o entre genomas generados en la misma célula donde tiene lugar la replicación.

5.5. Efecto antiviral de la ribavirina sobre poblaciones de LCMV

5.5.1. Efecto de la concentración de ribavirina sobre el título viral, la cantidad de ARN viral y la infectividad específica de LCMV

La Rib es una de las pocas drogas antivirales empleadas para el tratamiento de fiebres hemorrágicas asociadas a infecciones por Arenavirus, aunque su mecanismo de acción es desconocido (ver apartado 2.5.2 de la

RESULTADOS

Introducción). Para evaluar la sensibilidad de LCMV a la Rib se realizaron infecciones en células BHK-21 a MdI de 0.01 y 10 UFP/cél en ausencia y presencia de 5, 20 y 100 μ M de Rib, recogiendo el sobrenadante tras 48 hpi (Figura 5.5.1.1). El descenso producido por la Rib en el título viral en las infecciones a MdI de 0.01 fue más acusado que en las realizadas a MdI de 10 UFP/cél (5.2 y 3.7 logaritmos en las infecciones en presencia de 100 μ M de Rib, respectivamente), de modo análogo a lo observado en las infecciones en presencia de FU. El título viral en infecciones en ausencia de droga a MdI de 10 UFP/cél fue menor que a MdI de 0.01 UFP/cél, presumiblemente como consecuencia de la autointerferencia propia de LCMV.

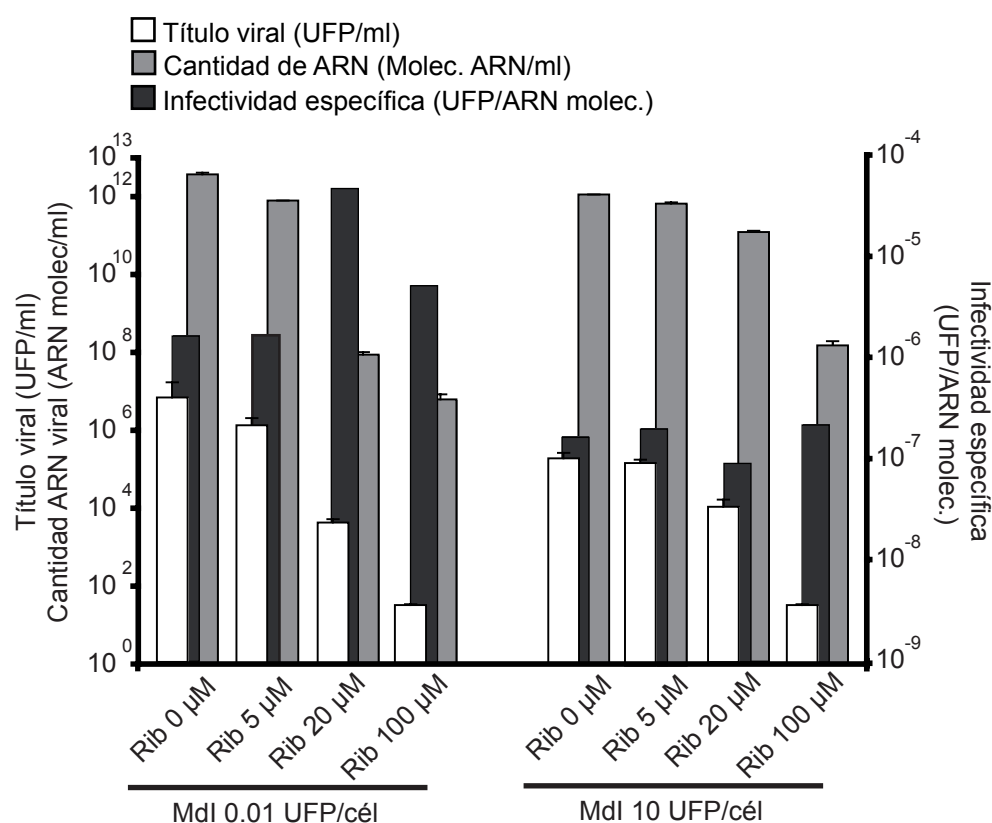


Figura 5.5.1.1. Efecto de la Rib sobre la producción de progenie infecciosa y de ARN viral e infectividad específica, en infecciones a MdI de 0.01 y 10 UFP/cél con LCMV en células BHK-21 a las 48 hpi. Las condiciones de infección se indican en los apartados 4.3 y 4.4.1 de Materiales y métodos.

Con objeto de profundizar en el mecanismo de la acción antiviral ejercido por la Rib sobre el LCMV, se infectaron células BHK-21 a Mdl de 10 UFP/cél, en presencia de 0, 20, 40, 60 y 100 μM de Rib, concentraciones que ejercían un efecto antiviral gradual y creciente. Se determinó la infectividad y se cuantificó el ARN viral de los sobrenadantes a las 0, 12, 24 y 48 hpi (Figura 5.5.1.2). El efecto inhibitorio de la Rib sobre el título viral fue proporcional a la concentración ensayada (exceptuando la infección a Rib 60 μM a las 24 hpi) y se hizo patente a todos los tiempos post-infección, indicando que el efecto antiviral de la Rib es efectivo a partir de tiempos tempranos. A concentraciones inferiores a 60 μM , la población viral incrementó la producción de progenie viral respecto al tiempo inicial; a 60 μM , el título se mantuvo con escasas variaciones a lo largo del tiempo; a 100 μM la producción de progenie infecciosa descendió hasta valores indetectables. La inhibición de la Rib sobre la cantidad de ARN viral fue la misma a 60 y 100 μM de Rib. Como consecuencia de una mayor inhibición en el título viral que en la cantidad de

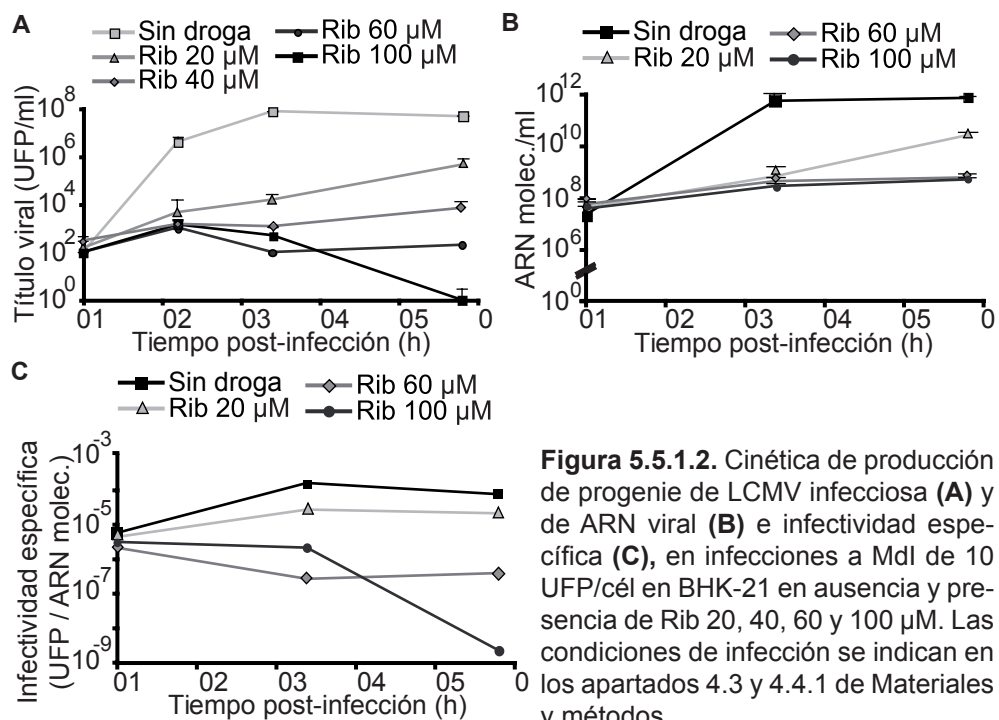


Figura 5.5.1.2. Cinética de producción de progenie de LCMV infecciosa (A) y de ARN viral (B) e infectividad específica (C), en infecciones a Mdl de 10 UFP/cél en BHK-21 en ausencia y presencia de Rib 20, 40, 60 y 100 μM . Las condiciones de infección se indican en los apartados 4.3 y 4.4.1 de Materiales y métodos.

RESULTADOS

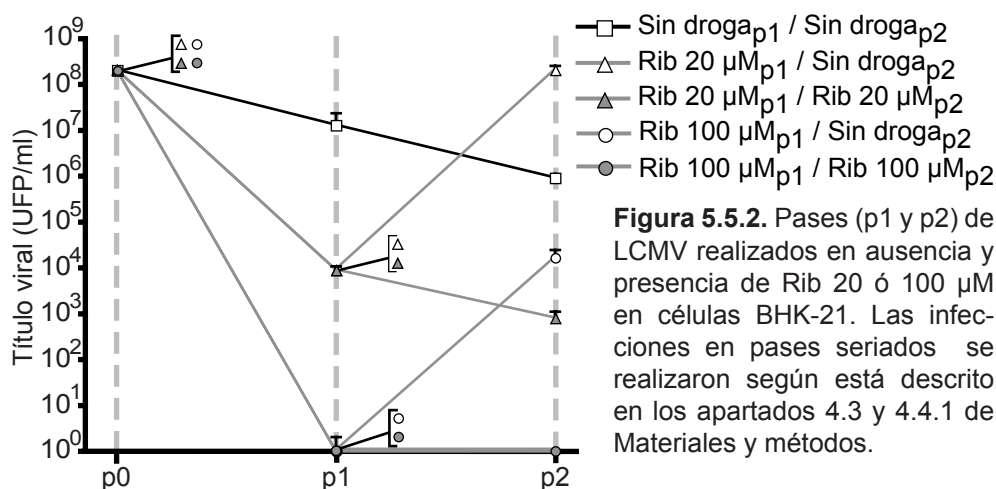
ARN, la infectividad específica disminuyó en todos los casos a medida que aumentó la concentración de Rib. El cálculo de la infectividad específica a las 48 hpi con Rib 100 μM se realizó asumiendo que el valor del título viral era el límite de detección (3.3 UFP/ml).

La Rib ejerce su efecto antiviral tanto sobre el título como sobre la cantidad de ARN, pero la inhibición de la cantidad de ARN viral producida alcanza su máximo al emplear concentraciones de 60 μM de droga. Estas diferencias son patentes desde tiempos tempranos de infección.

5.5.2. Efecto de la eliminación de ribavirina en el segundo pase

Con objeto de determinar si la inhibición ejercida por la Rib era reversible por la eliminación de la droga del medio de cultivo, se realizó un segundo pase en ausencia y presencia de 20 y 100 μM Rib, utilizando las poblaciones previamente obtenidas en ausencia y presencia de 20 y 100 μM Rib (Figura 5.5.2).

La eliminación de la droga en infecciones de Rib 20 μM en el segundo pase (Rib20_{p1} / Sin droga_{p2}) permite una recuperación de la producción de progenie infecciosa incluso por encima de las infecciones realizadas en ausencia de droga en ambos pases (Sin droga_{p1} / Sin droga_{p2}). En el segundo pase en presencia de la misma concentración de droga (Rib20_{p1} / Rib20_{p2}) se observa un descenso en el título viral de un logaritmo. La eliminación de la droga en infecciones en presencia de Rib 100 μM (Rib100_{p1} / Sin droga_{p2}) permite que la producción de progenie infecciosa se restaure más de 4 logaritmos. La presencia de 100 μM de Rib en el segundo pase mantiene el título viral por debajo del límite de detección (3.3 UFP/ml). En las infecciones realizadas en ausencia de droga (Sin droga_{p1} / Sin droga_{p2}), la disminución en la producción de progenie viral es posiblemente debida a la autointerferencia característica de LCMV. Los resultados indican que la inhibición ejercida



sobre el título viral, tanto a 20 como a 100 μ M, es reversible y se recupera la producción viral, al menos parcialmente, en un sólo pase en ausencia de droga.

5.5.3. Efecto de la guanosina en la inhibición ejercida por la ribavirina sobre la producción de LCMV en un solo pase

La *IMPDH* es una enzima de la vía metabólica de síntesis de GTP, que cataliza la oxidación de la inosina-5'-monofosfato dependiente del NAD a xantosina-5'-monofosfato (Figura 2.8). La Rib puede fosforilarse a Rib mono-, di- y trifosfato (RMP, RDP y RTP respectivamente) (Streeter, D. G. *et al.*, 1973; Zimmerman, T. P. *et al.*, 1978). La RMP es inhibidora de la *IMPDH*, produciendo un descenso en la concentración intracelular de GTP (Streeter, D. G. *et al.*, 1973; Snell, N. J., 2001; Airaksinen, A. *et al.*, 2003; Paeshuyse, J. *et al.*, 2011). En Picornavirus, la RTP puede incorporarse a la cadena de ARN en síntesis en lugar del ATP o el GTP, comportándose como un mutágeno para estos virus (Crotty, S. *et al.*, 2000; Graci, J. D. *et al.*, 2006; Sierra, M. *et al.*, 2007; Moriyama, K. *et al.*, 2008; Agudo, R. *et al.*, 2010; Ferrer-Orta, C. *et al.*, 2010) (Figura 2.9). La adición de G al medio de cultivo

RESULTADOS

restaura los niveles intracelulares de GTP alterados como consecuencia de la Rib (Zimmerman, T. P. *et al.*, 1978; Kerr, S. J., 1987; Lanford, R. E. *et al.*, 2001; Airaksinen, A. *et al.*, 2003).

Para evaluar si la alteración del nivel de GTP intracelular producido por la Rib era responsable del efecto antiviral de la droga, se realizaron infecciones a MdI de 10 UFP/cél en células BHK-21 en ausencia y presencia de Rib (20 y 100 μ M) y con o sin G (100 μ M). Las poblaciones obtenidas a las 48 hpi se titularon (Figura 5.5.3A) y se cuantificó la cantidad de ARN viral (Figura 5.5.3B). En presencia de 20 μ M de Rib, la G permitió recuperar hasta el 96.4% la producción de progenie infecciosa y hasta 99.4% la síntesis de ARN. En presencia de 100 μ M de Rib, la G recuperó hasta un 80.6% la producción de progenie infecciosa y un 100% la síntesis de ARN. Es decir, la acción de la G revierte, al menos parcialmente, la inhibición ejercida a nivel de título viral y totalmente la cantidad de ARN viral disminuidas por la Rib en ensayos realizados con un sólo pase del virus.

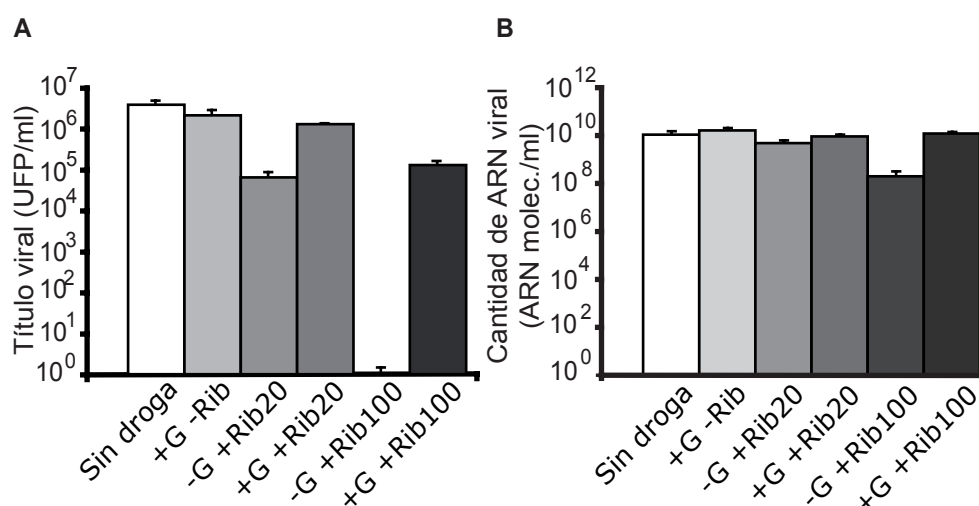


Figura 5.5.3. Efecto de la guanosina (G) sobre el título y ARN viral en infecciones de células BHK-21 con LCMV a MdI de 10 UFP/cél en BHK-21 en presencia de Rib (20 ó 100 μ M) y/o G (100 μ M). Las condiciones de infección se indican en los apartados 4.3 y 4.4.1 de Materiales y métodos.

5.5.4. Análisis genético de poblaciones de LCMV tratadas con ribavirina y guanosina

Los resultados del efecto de la Rib en ausencia y presencia de G eran compatibles tanto con una actividad exclusivamente inhibitoria o con una actividad dual mutagénica e inhibitoria de la Rib. Para distinguir entre estas dos posibilidades, se estudió la complejidad de las cuasiespecies de LCMV pasadas en presencia Rib y G. Para ello, se analizaron los espectros de mutantes de las poblaciones resultantes de las infecciones descritas en el apartado 5.5.3

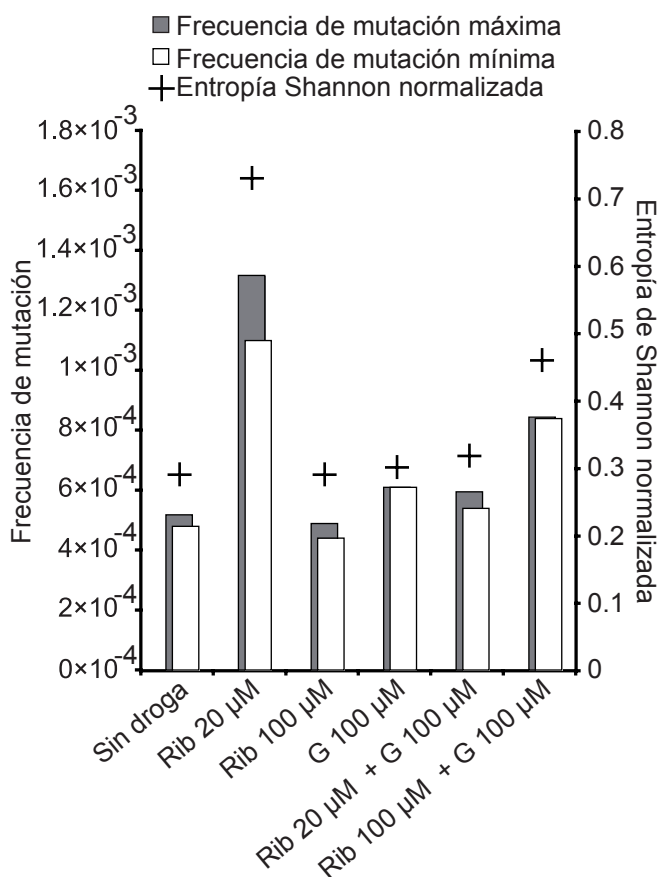


Figura 5.5.4.1. Complejidad de las cuasiespecies obtenidas en infecciones con LCMV en BHK-21 en presencia de Rib (20 o 100 µM) y/o guanosina (G) (100 µM). Las frecuencias de mutación y entropía de Shannon normalizada se determinaron de acuerdo a lo descrito en el apartado 4.15 de Materiales y métodos.

de Resultados (Figura 5.5.4.1). En ausencia de Rib, la G produjo un incremento moderado en la frecuencia de mutación, asociado a un mayor número de transiciones U→C.

Las poblaciones de LCMV obtenidas en presencia de 20 µM Rib, muestran diferencias significativas en las frecuencias de mutación mínima con respecto a las poblaciones pasadas en ausencia de droga ($p=10^{-3}$; χ^2 test). Estas diferencias son resultantes de un aumento en las frecuen-

RESULTADOS

cias de mutación específicas G→A y C→U (Figuras 5.5.4.1 y 5.5.4.2), que corresponde con el tipo de mutaciones producidas por la Rib en otros virus (Crotty, S. *et al.*, 2000; Agudo, R. *et al.*, 2010a). Por tanto, en nuestras condiciones de infección, la presencia de 20 μ M de Rib, tiene un efecto mutagénico sobre LCMV. Sin embargo, en las poblaciones de LCMV obtenidas en presencia de 100 μ M de Rib, la frecuencia de mutación no mostró diferencias significativas con respecto a las poblaciones pasadas en ausencia de droga

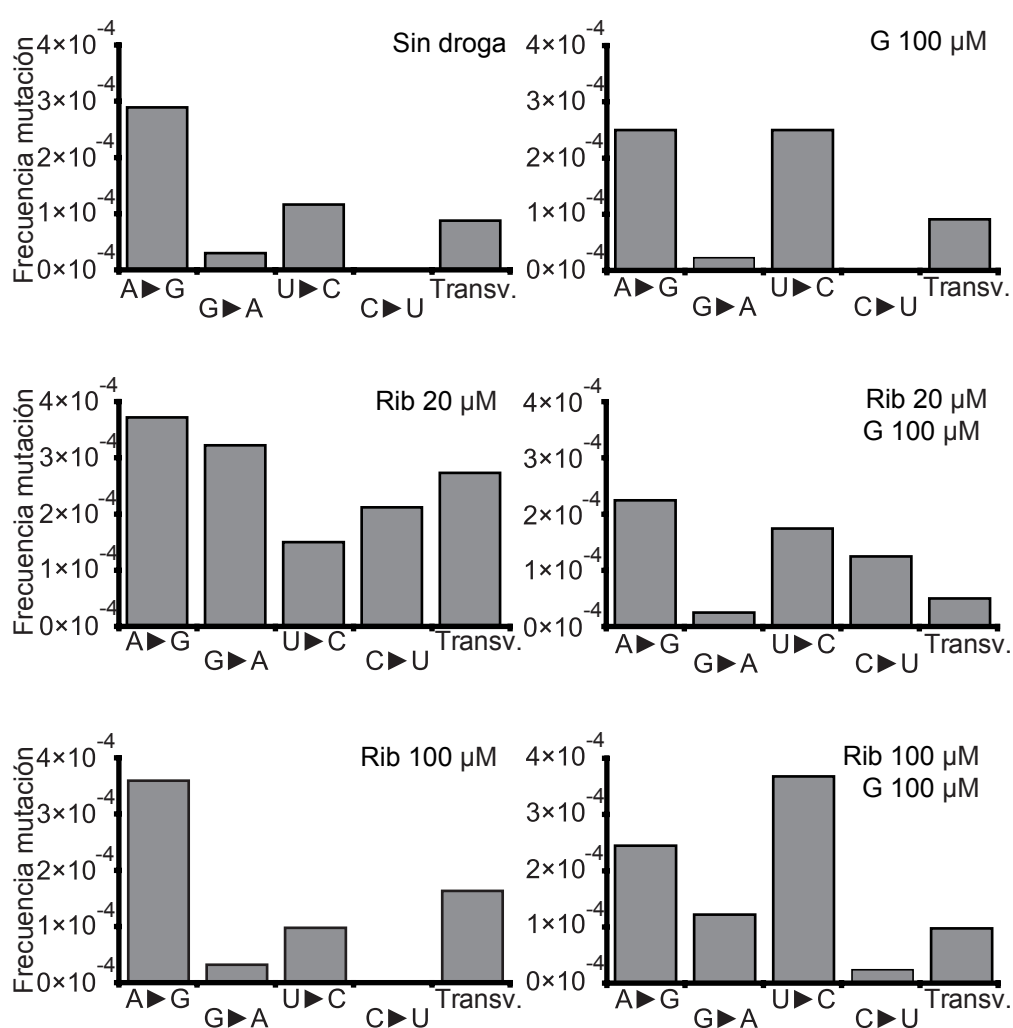


Figura 5.5.4.2. Frecuencias de mutación específicas para cada tipo de transición producidas por la presencia de Rib (20 o 100 μ M) y/o G (100 μ M). Las frecuencias de mutación específicas se determinaron de acuerdo a lo descrito en el apartado 4.15 de Materiales y métodos.

($p=0.858$; χ^2 test). Los resultados indican que el efecto antiviral ejercido por la Rib a 100 μM en LCMV resulta inhibitorio y no mutagénico.

En LCMV, la progenie obtenida de infecciones en presencia de 100 μM G, se observó un aumento no significativo ($p=0.585$; χ^2 test) en la frecuencia de mutación específica U \rightarrow C (Figuras 5.5.4.1 y 5.5.4.2). La presencia de 100 μM de G en las infecciones realizadas en presencia de Rib (20 ó 100 μM) eliminó las diferencias significativas originadas por el carácter mutagénico de la droga a dosis moderadas ($p=0.657$ y $p=0.09$ respectivamente; χ^2 test). Estos datos sugieren que la presencia de G evita la mutagénesis incrementada ejercida por Rib a 20 μM .

Los resultados establecen por primera vez una acción mutagénica de la Rib para Arenavirus y sugieren que el efecto antiviral de la Rib puede ser la resultante de un equilibrio entre una inhibición sobre la replicación viral ejercida por la droga a elevadas concentraciones y un efecto mutagénico observable a dosis bajas. En la discusión (apartado 6.2 de Discusión) se aborda la posibilidad de que la inhibición en presencia de concentraciones altas de Rib sea una consecuencia de mutagénesis letal o defección letal ejercida por la droga.

5.5.5. Efecto del ácido micofenólico en LCMV

El descenso de los niveles intracelulares de GTP debidos a la presencia de Rib en el medio de cultivo puede promover la incorporación de AMP y/o RMP en lugar de GMP al ARN en síntesis (Franklin, T. J. *et al.*, 1969). Para determinar si el efecto mutagénico de la Rib sobre el LCMV podía ser debido al descenso de los niveles intracelulares de GTP, se realizaron infecciones en ausencia y presencia de AMF (30 μM) y en ausencia y presencia de G (100 μM). El AMF es un inhibidor de la *IMPDH*, no incorporable al ARN en síntesis (Figura 5.5.5.1). La presencia de AMF 30 μM en el medio de cultivo

RESULTADOS

produce un descenso en el nivel de GTP en células BHK-21 equivalente al producido por 500 μM de Rib (Airaksinen, A. *et al.*, 2003).

El AMF redujo la producción de progenie infecciosa de LCMV entre 2.1 y 2.3 veces (Figura 5.5.5.2). Di-

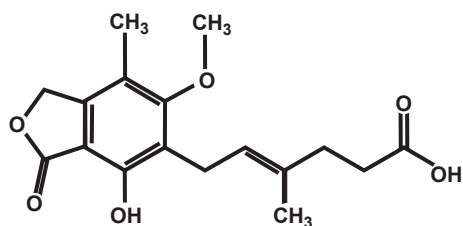


Figura 5.5.5.1 Estructura molecular del ácido micofenólico.

cho descenso es, al menos, 48000 veces inferior al observado con la Rib. El AMF no produjo un aumento de la complejidad del espectro de mutantes (Figura 5.5.5.3) sino que, por el contrario, originó un descen-

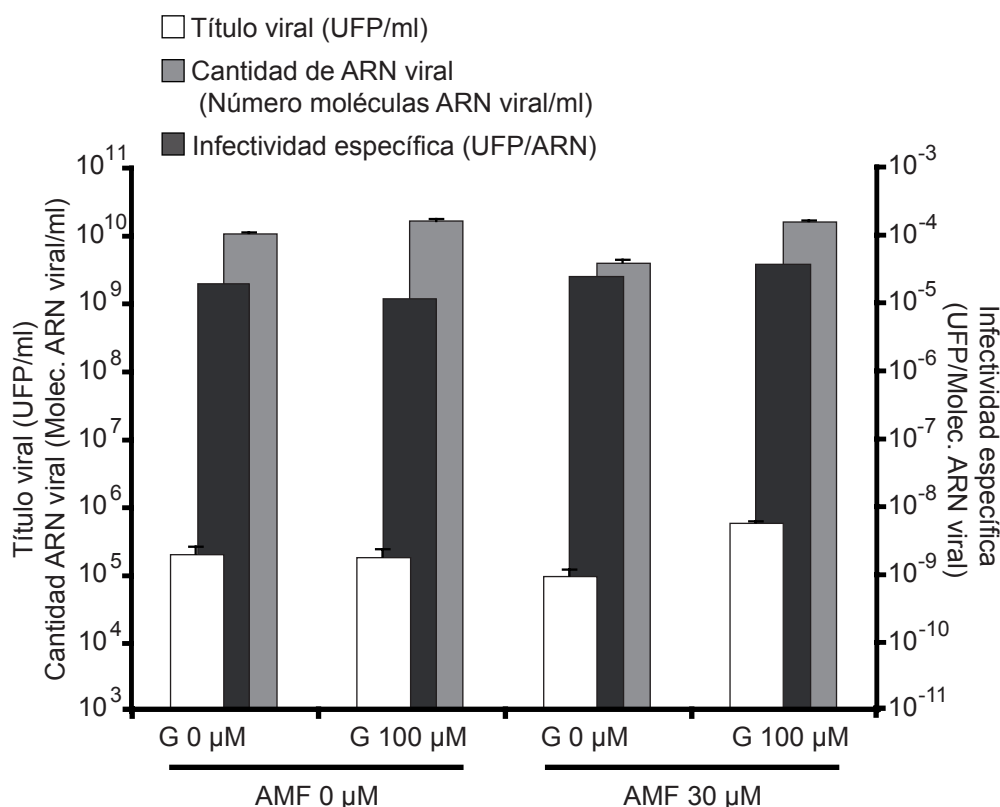


Figura 5.5.5.2. Efecto del ácido micofenólico (AMF, 30 μM) y/o guanosina (G, 100 μM) en el título, ARN viral e infectividad específica de LCMV en infecciones en células BHK-21 a Mdl de 10 UFP/cél. Las condiciones de infección se indican en los apartados 4.3 y 4.4.1 de Materiales y métodos.

so en la complejidad del espectro de mutantes asociado a una disminución de las frecuencia de mutación específicas A→G y U→C (Figura 5.5.5.4). Aunque la G compensa la inhibición sobre la producción de progenie infecciosa ejercida por el AMF (Figura 5.5.5.2), no sucede lo mismo con las frecuencias de mutación específicas A→G y U→C (que son transiciones mayoritarias en LCMV en ausencia de droga), que se reestablecen sólo ligeramente (Figura 5.5.5.4).

El AMF inhibió significativamente ($p < 0.05$; t-student test) la producción de ARN viral (Figura 5.5.5.2). Los agentes mutagénicos suele producir un descenso en la infectividad específica (González-López, C. *et al.*, 2004;

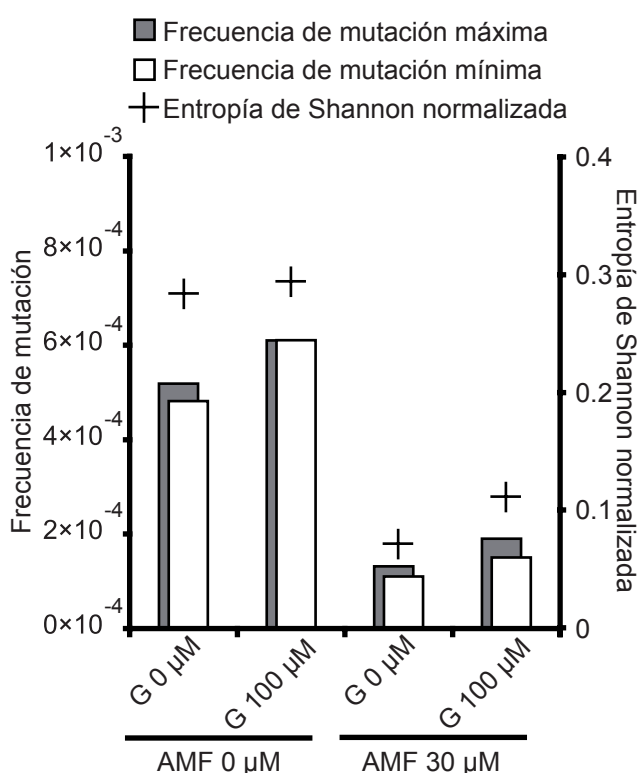


Figura 5.5.5.3. Complejidad de las cuasiespecies de LCMV obtenidas en infecciones en células BHK-21 en ausencia y presencia de ácido micofenólico (AMF, 30 μ M) y/o guanosina (G, 100 μ M) a Mdi de 10 UFP/cél. Las frecuencias de mutación y entropía de Shannon normalizada se determinaron de acuerdo a lo descrito en el apartado 4.15 de Materiales y métodos.

González-López, C. *et al.*, 2005; Grande-Pérez, A. *et al.*, 2005a; Grande-Pérez, A. *et al.*, 2005b; Agudo, R. *et al.*, 2008; Perales, C. *et al.*, 2009; Agudo, R. *et al.*, 2010; Perales, C. *et al.*, 2011), lo cual resulta coherente con una inhibición no mutagénica ejercida por el AMF, que no presenta ningún descenso en la infectividad específica (Figura 5.5.5.2).

Los resultados indican que el efecto mutagénico e inhibitorio ejercido por la Rib no es debido al

RESULTADOS

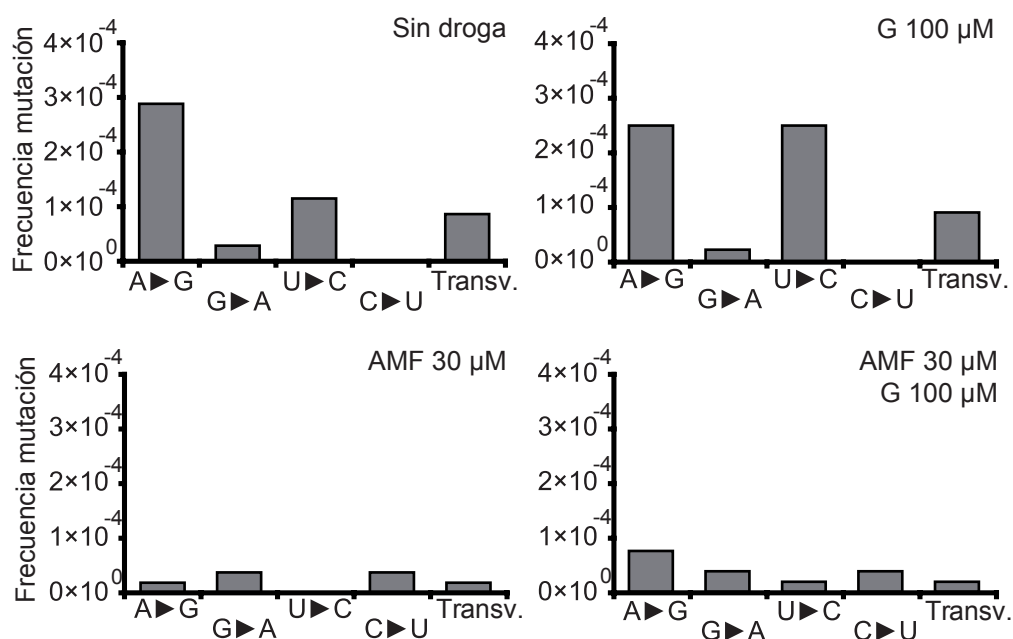


Figura 5.5.5.4. Frecuencias de mutación específicas para cada tipo de transición observadas en las cuasiespecies de LCMV obtenidas en ausencia y presencia de ácido micofenólico (AMF, 30 µM) y/o guanosina (G, 100 µM) en células BHK-21. Las frecuencias de mutación específicas se determinaron de acuerdo a lo descrito en el apartado 4.15 de Materiales y métodos. Transv.: Transversiones totales.

descenso en la concentración de GTP intracelular, ya que el AMF produce un desbalance en las concentraciones intracelulares de nucleótidos similar al de la Rib, sin producir los efectos antivirales ejercidos por la Rib ni alterar la infectividad específica del virus progenie.

5.5.6. Efecto de la ribavirina en pases de LCMV en células BHK-21

Para confirmar en otras condiciones experimentales el efecto inhibitorio y mutagénico observado al tratar las poblaciones de LCMV con Rib en un sólo pase, se realizaron un total de 9 pases seriados del virus, infectando a MdI de 0.01 UFP/cél, en ausencia y presencia de Rib (10 µM) y en ausencia y presencia de G (100 µM) (Figura 5.5.6.1).

Análogamente a lo observado en las infecciones a MdI de 10 UFP/cél en los primeros pases de LCMV en presencia de Rib se inhibió fuertemente la producción de virus infeccioso, observándose también un descenso en la cantidad de ARN viral en el primer pase (Figura 5.5.6.1). La frecuencia de mutación en el espectro de mutantes del virus del pase 1 en presencia de Rib aumentó ligeramente respecto al pase 1 en ausencia de la droga (diferencias no

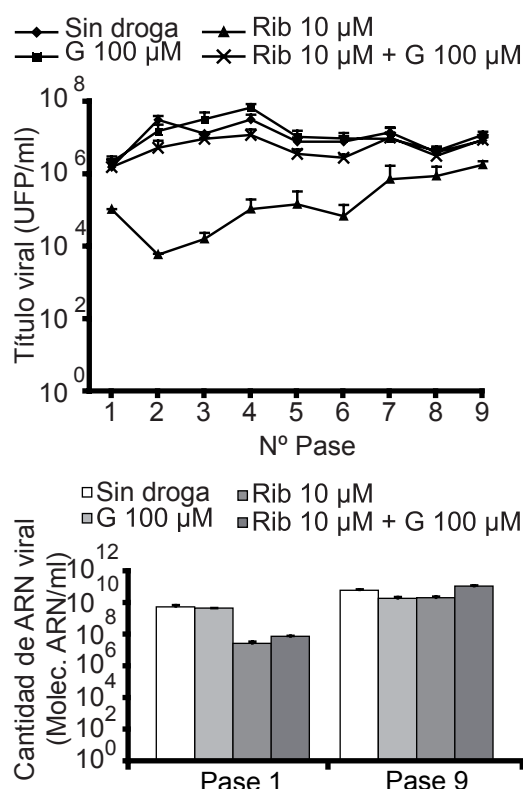


Figura 5.5.6.1. Pases de LCMV en células BHK-21 realizados en ausencia y presencia de G 100 µM y/o Rib 10 µM. Las infecciones en pases seriados se realizaron según está descrito en los apartados 4.3 y 4.4.1 de Materiales y métodos.

es más de 5 veces superior que en ausencia de droga (diferencias estadísticamente significativas, χ^2 test, $p < 10^{-4}$). Además, hay un incremento de 3 veces en la entropía de Shannon normalizada (Figura 5.5.6.2). Los resultados sugieren que los pases seriados de LCMV realizados en presencia de dosis muy

significativas; $p=0.26$, χ^2 test) (Figura 5.5.6.2). En el primer pase, la G revirtió la inhibición ejercida por la Rib sobre la producción de progenie infecciosa pero no sobre la cantidad de ARN viral. La inhibición del título viral se atenuó con los pases en presencia de Rib, recuperándose tanto el título como el ARN viral en el pase 9. Asimismo, la infectividad específica del virus en el pase 9 fue ligeramente superior en presencia de 10 µM de Rib que en ausencia de la misma droga. Sin embargo, a pesar de la reversión observada en el título viral, la cantidad de ARN viral y la infectividad específica, la frecuencia de mutación en el pase 9 en presencia de Rib

RESULTADOS

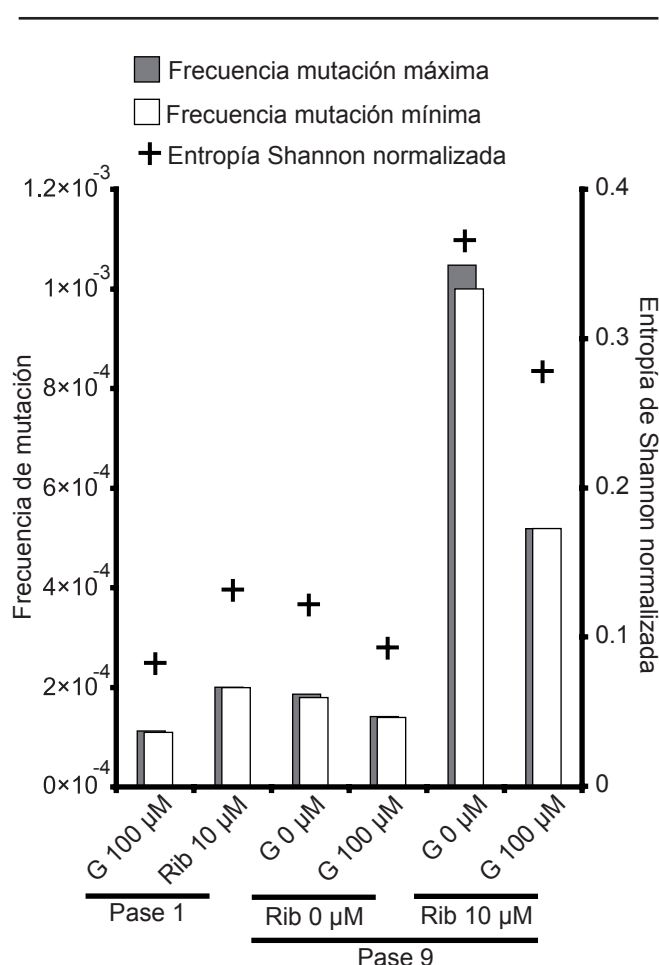


Figura 5.5.6.2. Complejidad de las cuasiespecies de LCMV obtenidas en los pases 1 y 9 en células BHK-21 en ausencia y presencia de Rib (10 μM) y/o guanósina (G, 100 μM). Las frecuencias de mutación y entropía de Shannon normalizada se determinaron de acuerdo a lo descrito en el apartado 4.15 de Materiales y métodos.

to de la producción de progenie viral infecciosa entre el pase 1 y el pase 9 en presencia de Rib (Figura 5.5.6.1) podría deberse a que la concentración droga (10 μM) es suficientemente baja para mantener capacidad replicativa viral intacta pero capaz de ejercer un efecto mutagénico que, aunque sensible transcurridos 9 pases (Figuras 5.5.6.2 y 5.5.6.3), permite que la cuasiespecie evolucione hasta adquirir una producción de progenie viral similar a la del virus pase 9 en ausencia de Rib.

bajas de Rib (10 μM) producen un incremento en la frecuencia de mutación pero permiten la replicación del virus y la recuperación del título viral.

Se han realizado numerosos experimentos encaminados a la obtención de una población de LCMV con sensibilidad disminuida a Rib (entre los que se incluyen pases seriados con el virus pase 9 obtenido en ausencia y presencia de Rib, en presencia de concentraciones de Rib que producen la extinción viral), aunque todos han resultado infructuosos. Este hecho sugiere que el incremento

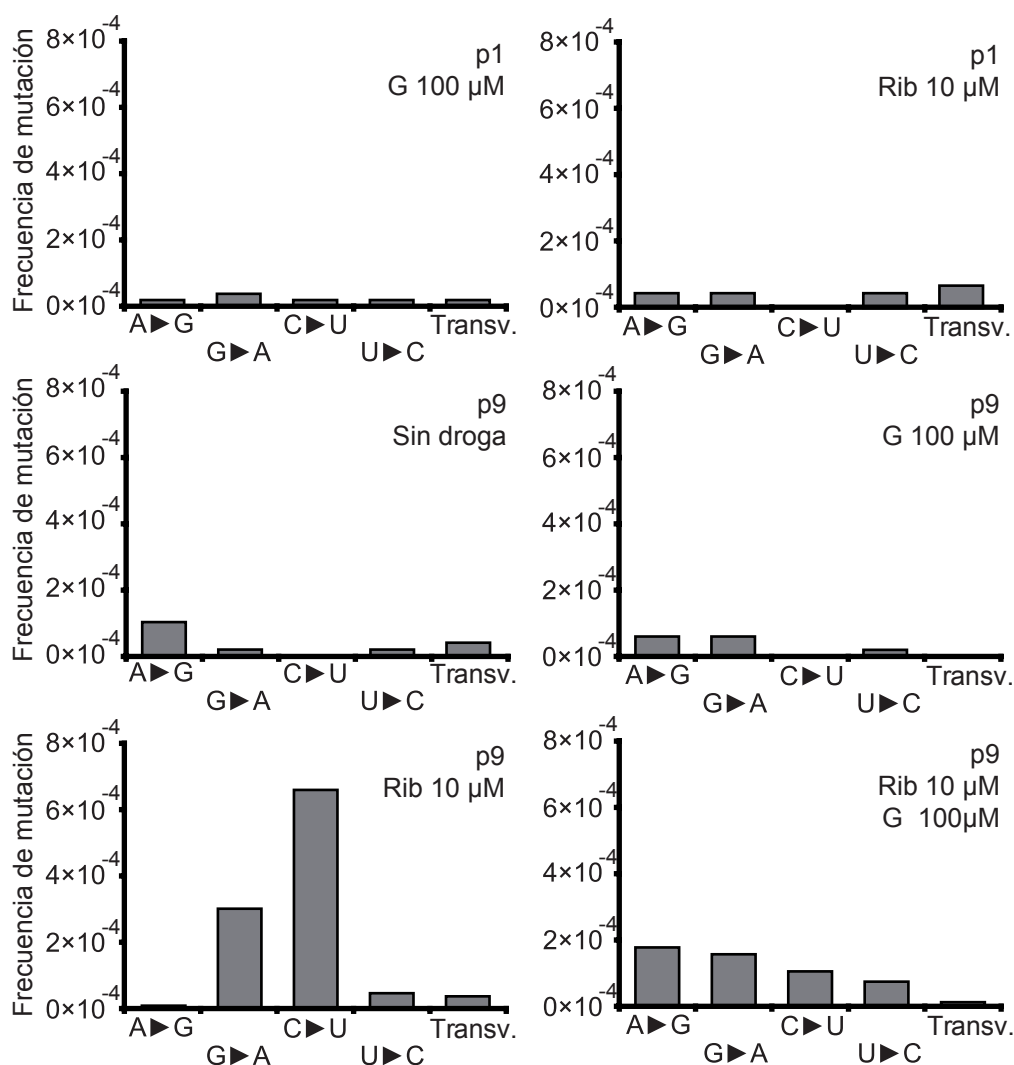


Figura 5.5.6.3. Frecuencias de mutación específicas observadas en las cuasiespecies de LCMV en los pases 1 y 9 en células BHK-21 en ausencia y presencia de Rib (10 μ M) y/o guanosina (G, 100 μ M). Las frecuencias de mutación específicas se determinaron de acuerdo a lo descrito en el apartado 4.15 de Materiales y métodos. Transv.: Transversiones totales

El sesgo mutacional observado en el pase 9 en presencia de Rib es el característico de la droga (G→A y C→U) (Figuras 5.5.6.2 y 5.5.6.3). Además, dicho sesgo, desaparece con la presencia de G en el medio de cultivo en el pase 9 (Figura 5.5.6.3). En estas condiciones, la Rib también es claramente mutagénica para LCMV.

RESULTADOS

5.6. Administración de ribavirina y 5-fluorouracilo en LCMV de manera combinada y secuencial

5.6.1. Efecto de ribavirina y 5-fluorouracilo sobre LCMV con distintos protocolos de administración

Estudios anteriores en el laboratorio con LCMV y FMDV sugirieron que la baja carga viral puede favorecer la extinción de virus (Grande-Pérez, A. *et al.*, 2005b; Sierra, M. *et al.*, 2007). Asimismo, resultados obtenidos en la presente tesis doctoral sugerían que las poblaciones obtenidas a partir de una MdI menor resultaban más sensibles a FU que infecciones realizadas a MdI mayores (Moreno, H. *et al.*, 2012) (apartado 5.3 de Resultados y Figura 5.3.1). Por otra parte, estudios con FMDV han sugerido que mientras que la administración combinada de dos inhibidores es más eficiente que la correspondiente administración secuencial para disminuir la carga viral, cuando uno de los componentes de la terapia es un mutágeno, la administración secuencial inhibidor→mutágeno puede resultar más ventajosa (Perales, C. *et al.*, 2009). Para explorar la posibilidad de incrementar el efecto antiviral del FU, aprovechando la función dual de la Rib como mutágeno e inhibidor, se estudió el efecto de la combinación de drogas (inhibidor y mutágeno) en la inhibición de la producción de LCMV. Para ello, se infectaron células BHK-21 con LCMV Arm53b a MdI de 10 UFP/cél. Las células se trataron con Rib (20 μ M) o FU (35 μ g/ml) o con ambas de manera combinada (FU+Rib) o secuencial (Rib→FU y FU→Rib). El esquema de la administración seguida en cada caso se ilustra en la Figura 5.6.1.1. Se preincubaron las células con las drogas correspondientes en el caso de la administración combinada y con la primera droga de la secuencia en el caso de la administración secuencial. Se titularon muestras de los sobrenadantes a las 0, 12, 24, 36, 48, 60 hpi (Figura 5.6.1.2). Conviene mencionar que en el caso de las terapias secuenciales, en los puntos correspondientes a las 0 y 12 hpi, las poblaciones virales únicamente han estado expuestas a la primera droga de la secuencia (Figura 5.6.1.1). En las te-

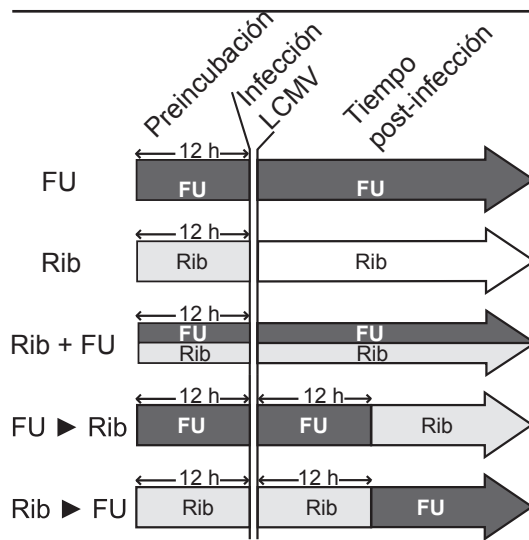


Figura 5.6.1.1. Esquema seguido de los protocolos de administración de FU y Rib durante infecciones de células BHK-21 con LCMV. De arriba a abajo se indican las horas de tratamiento con cada droga, o combinación de drogas, antes y después de la infección con LCMV. Los procedimientos se describen en el apartado 4.3 y 4.4.1 de Materiales y métodos.

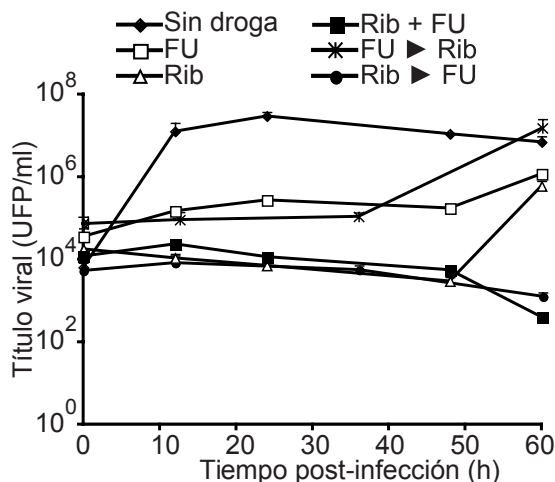


Figura 5.6.1.2. Efecto de la administración secuencial (FU > Rib y Rib > FU), de combinación (Rib+FU) y monodroga (FU y Rib). Las condiciones de infección en ausencia y presencia de drogas se indican en el apartado 4.3 y 4.4.1 de Materiales y métodos.

rapias monodroga el título viral a las 60 hpi se inhibió un 83.3% con FU y 91.4% con Rib. La terapia secuencial Rib→FU resultó ser más inhibitoria que la terapia en formato contrario (FU→Rib), inhibiendo el título viral un 99.9%. La administración de manera secuencial de Rib→FU produce una inhibición sobre la producción de progenie infecciosa similar a la combinación de ambas drogas (Rib+FU), a pesar de que el tiempo de exposición a dichas drogas es mucho más reducido.

5.6.2. Efecto de la concentración de ribavirina en la administración combinada y secuencial

Los resultados anteriores indicaron que el grado de inhibición era similar entre la administración combinada (FU+Rib) y la secuencial Rib→FU, a pesar de que el tiempo de exposición a la droga en el caso de la combinada era el doble que

RESULTADOS

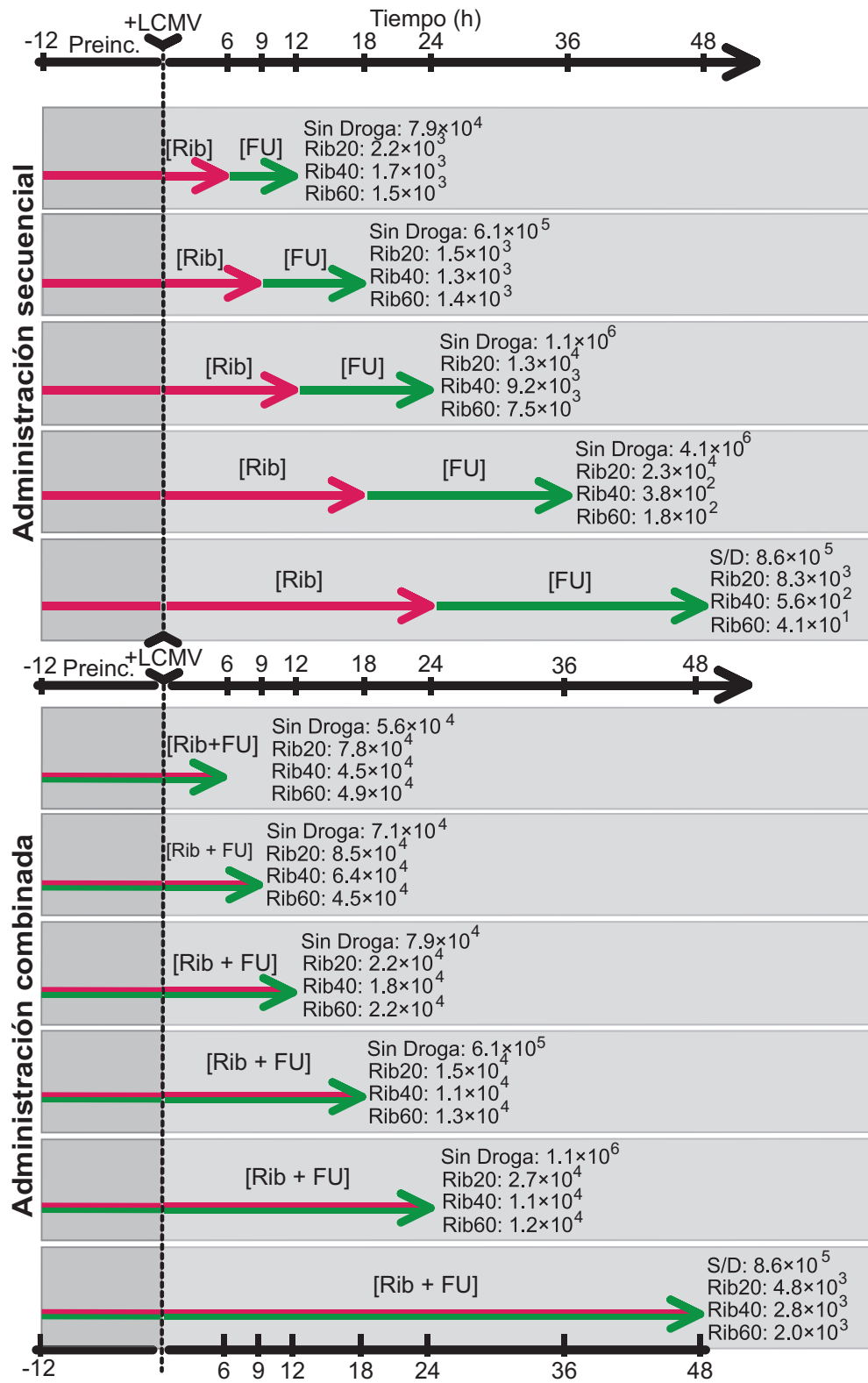
en la secuencial. Para evaluar el efecto de distintas concentraciones de Rib, se infectaron células BHK-21 con LCMV Arm53b a MdI de 10 UFP/cél, en presencia de Rib (20, 40 y 60 μ M) y FU (35 μ g/ml), de manera individual, combinada (Rib+FU) o secuencial (Rib→FU) (Figura 5.6.2.1).

Los resultados indican una mayor inhibición de la producción viral de manera secuencial inhibidor→mutágeno que con la combinada, tanto en la de producción de progenie infecciosa (Figura 5.6.2.2A) como de ARN viral (Figura 5.6.2.2B). La inhibición ejercida en la administración secuencial es directamente proporcional a la concentración de Rib empleada. En este tipo de administración, las dosis mutagénicas de Rib (20 μ M) permiten un ligero aumento del título y de la cantidad de ARN viral a medida que pasa el tiempo, mientras que dosis inhibitorias de Rib (60 μ M) tienden a aumentar la inhibición con el tiempo. En el protocolo combinado no se observan diferencias significativas en ningún momento en función de la concentración de Rib empleada. Las diferencias observadas con las diferentes concentraciones de Rib utilizadas en la administración combinada y secuencial comienza a hacerse patente a partir de las 12 horas de exposición; a tiempos de exposición menores no se observan diferencias. El protocolo de administración que produce una mayor inhibición de producción de progenie infecciosa y ARN viral es Rib60→FU35 (Figura 5.6.2.2).

Las concentraciones inhibitorias de Rib (60 μ M) incrementan la eficacia de la administración secuencial, pero no de la combinada. Concentraciones mutagénicas de Rib (20 μ M) producen un efecto antiviral similar en ambos formatos de administración.

[Página siguiente] Figura 5.6.2.1. Esquema seguido para el tratamiento de infecciones de LCMV en células BHK-21 con LCMV tratadas con FU y/o Rib en formato secuencial (→→) o combinado (→→). Se indica el título viral (UFP/cél) obtenido al final de cada tratamiento, empleando 0, 20, 40 ó 60 μ M de Rib. Las condiciones de infección en ausencia y presencia de drogas se indican en el apartado 4.3 y 4.4.1 de Material y Métodos.

RESULTADOS



Resultados

RESULTADOS

5.6.3. Análisis genético de las poblaciones de LCMV tras la administración de ribavirina y 5-fluorouracilo de manera combinada y secuencial

Dado que el carácter mutagénico de la Rib se observó únicamente a concentraciones bajas de la droga (Figuras 5.5.4.1 y 5.5.4.2), resultaba interesante comparar los espectros de mutantes de las poblaciones de LCMV resultantes de los tratamientos secuenciales y de combinación cuando se emplearon dosis mutagénicas e inhibitorias de Rib (Apartado 5.6.2 de Resultados) y se analizó la complejidad del espectro de mutantes a las 24 horas de exposición a cada droga.

El espectro de mutantes fue siempre más complejo en las poblaciones en las que se emplearon las drogas de manera secuencial y, además, la com-

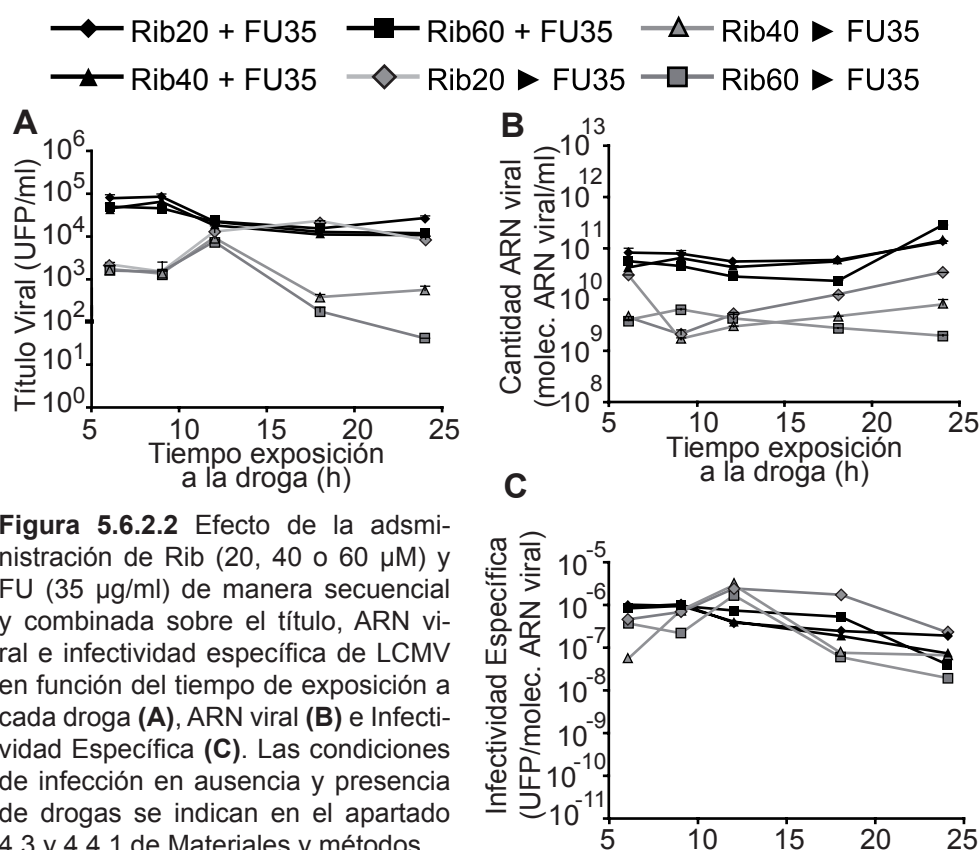


Figura 5.6.2.2 Efecto de la administración de Rib (20, 40 o 60 μ M) y FU (35 μ g/ml) de manera secuencial y combinada sobre el título, ARN viral e infectividad específica de LCMV en función del tiempo de exposición a cada droga (A), ARN viral (B) e Infectividad Específica (C). Las condiciones de infección en ausencia y presencia de drogas se indican en el apartado 4.3 y 4.4.1 de Materiales y métodos.

plejidad aumentó con la concentración de Rib empleada (Figura 5.6.3.1). Las mutaciones observadas en las cuasiespecies de las poblaciones sometidas a terapia combinada son mayoritariamente las transiciones A→G. Las mutaciones observadas en ausencia de droga fueron A→G y en menor medida, U→C, confirmando observaciones anteriores (Figura 5.6.3.2). Las mutaciones producidas por dosis mutagénicas de Rib (20 μM) fueron G→A y C→U, lo que resulta coherente con resultados previos de esta tesis y de otros sistemas virales (Airaksinen, A. *et al.*, 2003; Agudo, R. *et al.*, 2010a). En LCMV, el FU produce mayoritariamente las transiciones A→G y U→C (Figura 5.3.3.2) (Grande-Pérez, A. *et al.*, 2002; Grande-Pérez, A. *et al.*, 2005a; Grande-Pérez, A. *et al.*, 2005b; Martin, V. *et al.*, 2010; Moreno, H. *et al.*, 2011). El tratamiento secuencial Rib20→FU35 produjo un incremento moderado, respecto al observado en la administración combinada de ambas drogas, en las mutaciones mayoritariamente G→A y C→U, típicas de la Rib 20 μM y, además, un aumento de A→G, atribuibles al FU. En las infecciones en las que se emplearon concentraciones inhibitorias de Rib (60 μM) en monoterapia, se observa una disminución en la frecuencia de mutación, detectando únicamente cambios G→A y C→U (Figura 5.6.3.2). En la administración secuencial Rib60→FU35 se observó un incremento en las frecuencias de mutación específicas de A→G y U→C atribuibles al FU, pero además, un incremento en las frecuencias de mutación específicas producidas por la Rib (G→A y C→U). Probablemente, la concentración intracelular de Rib disminuye una vez se ha cambiado el medio (cambio Rib→FU), alcanzando dosis que permiten la replicación viral y que resultan mutagénicas para el virus. Asimismo, el incremento, en todos los protocolos, de la frecuencia de mutación específica A→G puede ser debido al hecho de que este tipo de mutación es la predominante durante la replicación de LCMV en ausencia de droga. El incremento en las frecuencias de mutación y frecuencias de mutación específicas (así como la entropía de Shannon normalizada) es siempre mayor en las administraciones secuenciales que en las combinadas, independientemente de la concentración

RESULTADOS

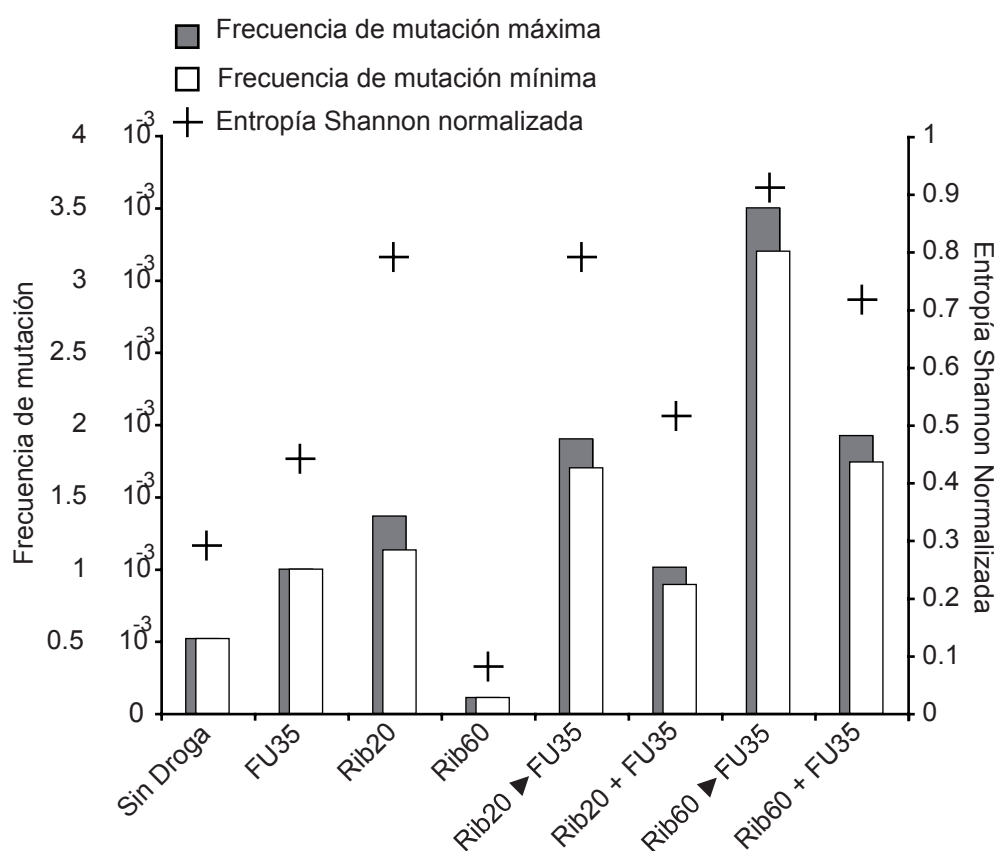


Figura 5.6.3.1. Efecto de la administración de manera combinada (+) y secuencial (►) sobre la complejidad de la cuasiespecie obtenidas de infecciones con LCMV en células BHK-21 a Mdl de 10 UFP/cél. Las diferencias en frecuencias de mutación observadas entre los dos formatos de administración (combinado y secuencial), así como las observadas entre las concentraciones de Rib empleadas (20 y 60 μ M) para un mismo formato de administración, resultaron significativas en todos los casos ($p < 0.05$, χ^2 test). De cada población se analizaron un mínimo de 60 clones). Las frecuencias de mutación y entropía de Shannon normalizada se determinaron de acuerdo a lo descrito en el apartado 4.15 de Materiales y métodos.

de Rib empleada. Los resultados confirman, además, la dualidad en el efecto antiviral de la Rib como mutágeno a dosis moderadas y como inhibidor a dosis elevadas. Los resultados sugieren que la reducción de la carga viral por la inhibición sobre la replicación viral, mediante dosis inhibitorias de Rib, permite una mayor propagación de las mutaciones producidas posteriormente por el FU, incrementando la complejidad del espectro de mutantes y aumentando el efecto antiviral del mutágeno.

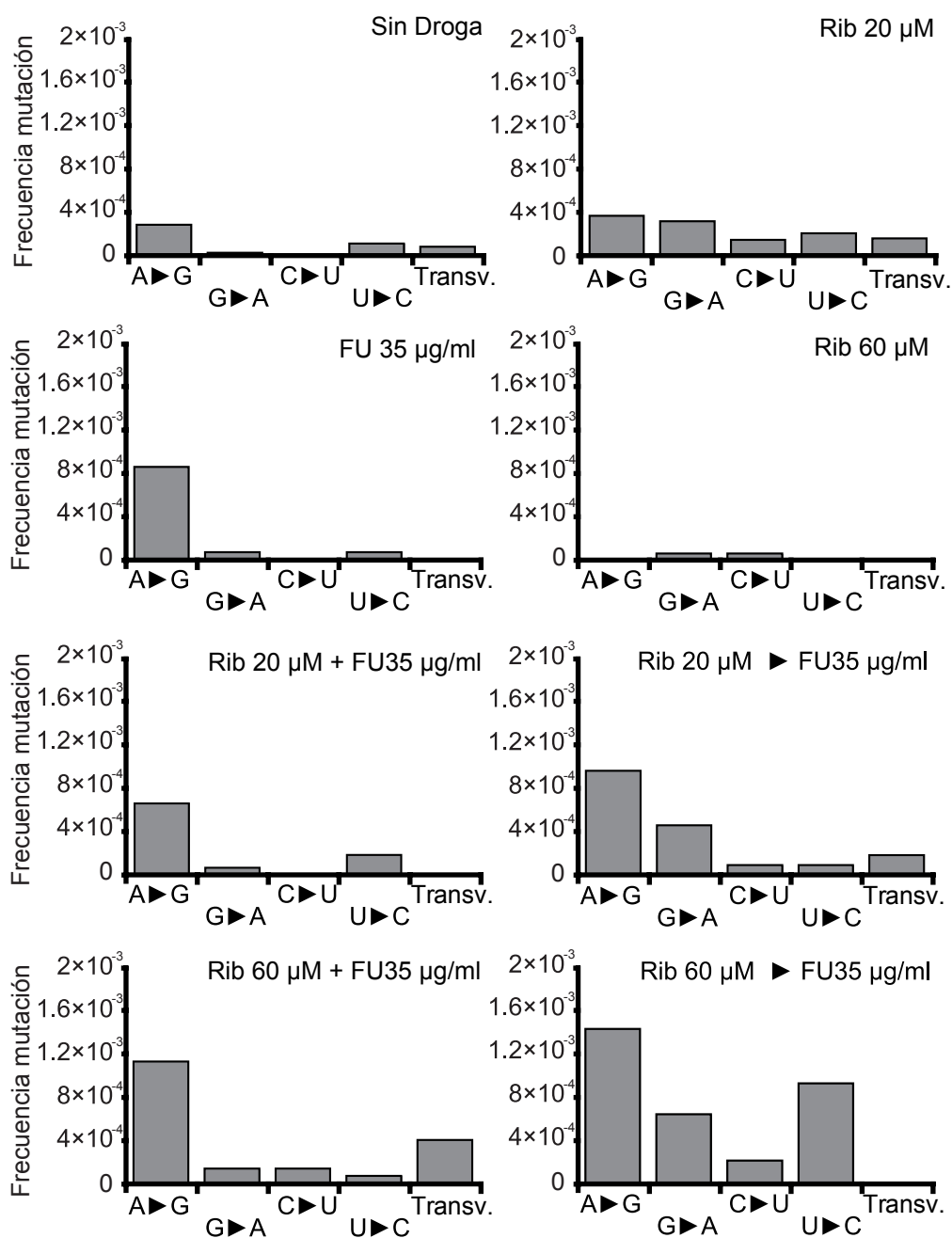


Figura 5.6.3.2. Tipos de mutaciones observadas en las cuasiespecies resultantes de la administración de manera secuencial (►) y combinada (+) en infecciones con LCMV de células BHK-21 a Mdl de 10 UFP/cél. Las frecuencias de mutación específicas se determinaron de acuerdo a lo descrito en el apartado 4.15 de Materiales y métodos. Transv.: Transversiones totales

RESULTADOS

5.7. Caracterización biológica de mutantes en el dominio exonucleasa 3'-5' de la nucleoproteína de LCMV

La aparición de mutantes de fidelidad de copia incrementada en una población viral constituye un importante escollo para la eficacia de la catástrofe de error como terapia antiviral. Por tanto, disponer de mutantes de LCMV con distinta complejidad en su espectro de mutantes sería una importante herramienta para estudios de mutagénesis letal en Arenavirus. En este apartado se describen experimentos iniciales llevados a cabo en el laboratorio del Dr. Juan Carlos de la Torre (The Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA), bajo su supervisión.

Durante la replicación de LCMV, se forma un complejo NP:L (Kerber, R. *et al.*, 2011), por lo que mutaciones tanto en la NP como en la L podrían afectar a la fidelidad de copia o la procesividad del complejo replicativo durante la síntesis de ARN viral. Además, la secuencia aminoacídica predice la formación de un dominio *Exo3'-5'* en la NP de LCMV. Por este motivo, se introdujeron, por mutagénesis dirigida, mutaciones que dan lugar a las sustituciones D382A, D459A, H517A y D522A de la NP. Estos residuos constituyen el centro catalítico del dominio *Exo3'-5'* en la proteína NP. Este dominio, en virus del género coronavirus, está asociado a una actividad correctora de errores durante la replicación viral, y las mutaciones deletéreas en el mismo producen un incremento de 15 veces en la frecuencia de mutación (Eckerle, L. D. *et al.*, 2007; Eckerle, L. D. *et al.*, 2010; Denison, M. R. *et al.*, 2011). Por tanto, la investigación del dominio *Exo3'-5'* de la NP por mutagénesis dirigida resultaba interesante tanto por el estudio de la función desempeñada por dicho dominio en el ciclo de vida de LCMV así como por el posible efecto de las mutaciones en la complejidad del espectro de mutantes.

5.7.1. Pases seriados del mutante D382A en células BHK-21

Inicialmente se realizaron experimentos empleando el mutante D382A, ya que esta sustitución afecta a la posición más relevante en la catálisis de la reacción exonucleasa. El mutante D382A fue obtenido por primera vez por Sebastian Emonet y Beatrice Cubitt en el laboratorio del Dr. Juan Carlos de la Torre, afectando a la proteína NP de LCMV Clon13. El virus portador de la sustitución D382A se rescató a partir de los plásmidos y resultó activo en el ensayo de *minigenoma*. Se verificó la presencia de la mutación deseada (GCT) en el pase 0 (virus obtenido de transfección). Todos los experimentos se realizaron utilizando como inóculo el sobrenadante de una infección en células BHK-21NP (D382Ap1) con el mutante de ese pase (D382Ap0), que se denomina como mutante en la presente tesis doctoral.

Para determinar el efecto de la mutación D382A en la población de LCMV, se realizaron 9 pases con el virus mutante y con el virus silvestre en células BHK-21 (Figura 5.7.1). Las diferencias en producción de progenie infecciosa entre el virus mutante y el silvestre disminuyen a medida que se suceden los pases. Se secuenciaron los pases titulados y se verificó la presencia de la mutación D382A en los pases 2 y 3 en ambas réplicas del virus mutante así como la presencia del residuo D en la misma posición en el virus silvestre. Sin embargo en ambas réplicas del virus mutante, la posición revirtió a D en el pase 5 (GCT→GAT, Figura 5.7.1). Mientras que el codón codificante del aspártico 382 presente en el virus silvestre era GAC (Asp), el codón presente en el virus revertiente era GAT (Asp) y en el mutante GCT (Ala) (Figura 5.7.1). Por tanto, mientras que el mutante D382A contenía dos mutaciones nucleotídicas (T1638G y G1637T), la reversión observada contenía sólo una (G1638T). Las mutaciones y codones indicados se corresponden con los presentes en el ARN de polaridad positiva.

Este resultado sugiere que la función desempeñada por el residuo aspártico en la posición 382 debe ser importante para la viabilidad del virus, ya que

RESULTADOS

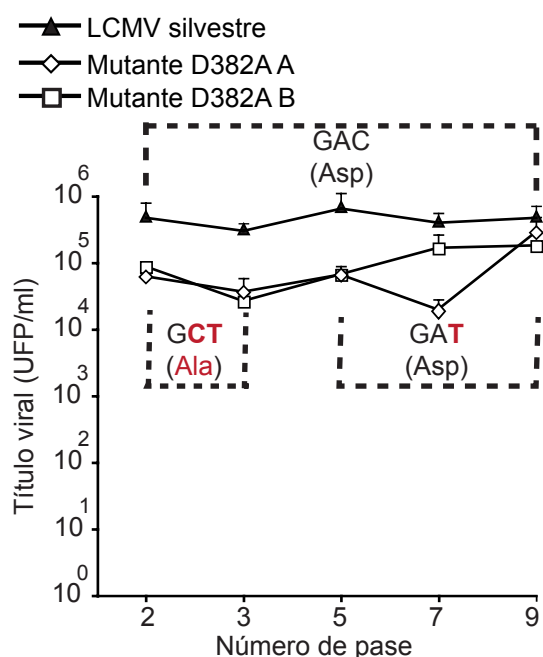


Figura 5.7.1. Título viral de los virus silvestre y el mutante D382A de LCMV (por duplicado, en experimentos independientes) a lo largo de 9 pases. Se indica el codon y el aminoácido correspondiente para cada virus y en rojo los residuos mutados respecto al virus silvestre. La obtención del mutante D382A y las condiciones de infección se detallan en el apartado 4.4.1 y 4.8 de Materiales y métodos respectivamente.

su afectación conlleva un descenso de la producción de progenie infecciosa y permite una replicación residual y la reversión a la posición aminoacídica original lo que permite recuperar el título viral del virus revertiente en los pases siguientes.

5.7.2. Complementación *en trans* del título viral y de la cantidad de ARN viral del mutante D382A en células BHK-21_{NP}

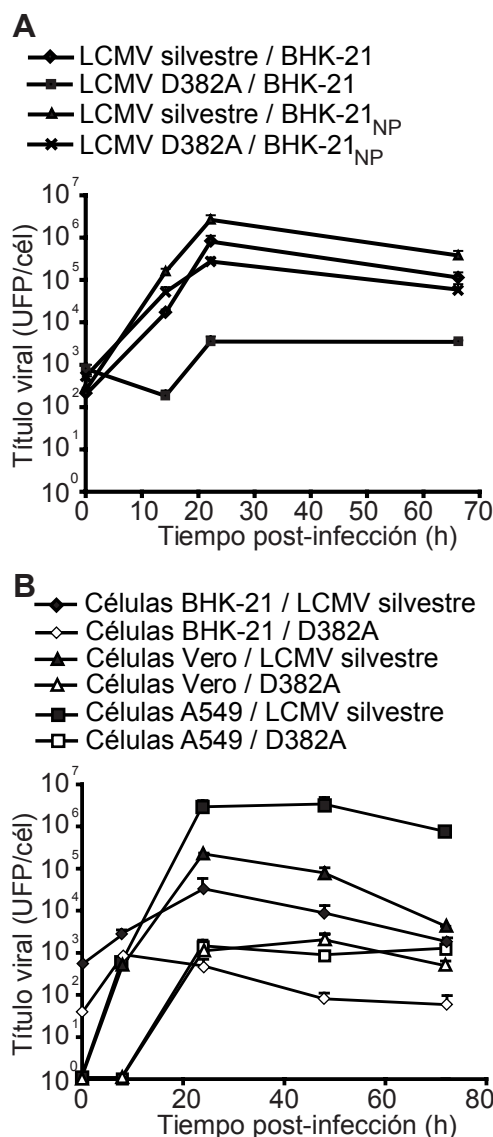
Tal y como ha sido descrito en los apartados anteriores de esta tesis, las interacciones positivas (o complementación) o negativas (o interferencia) entre genomas o componentes virales

es uno de los elementos fundamentales que permiten la evolución de las cuasiespecies como unidades de selección. Con objeto de determinar si era posible la complementación de la función o funciones afectadas en el mutante D382A mediante la expresión de la NP silvestre, se realizaron infecciones con LCMV silvestre y LCMV D382A en células BHK-21 y BHK-21_{NP} (la expresión de la proteína NP en las células BHK-21_{NP} no compromete la viabilidad celular). Se recogieron los sobrenadantes a las 0, 12, 24 y 66 hpi (Figura 5.7.2A). Los resultados indican una complementación del 64% al comparar la población LCMV Silvestre / BHK-21_{NP} y LCMV D382A / BHK-21_{NP}. La expresión de la NP por parte de la célula infectada (BHK-21_{NP}) incrementa

un 15% la producción de progenie infecciosa del LCMV silvestre (comparar LCMV Silvestre / BHK-21_{NP} y LCMV Silvestre / BHK-21).

Los resultados obtenidos indican que la NP silvestre es capaz de complementar en trans las funciones afectadas en el mutante D382A.

5.7.3. Producción de progenie infecciosa del mutante D382A en distintos tipos celulares



Con objeto de estudiar el efecto de la mutación D382A en la actividad anti-IFN característica de LCMV Clon 13 (ver apartado 2.4.2 de Introducción), se realizaron infecciones con el virus LCMV silvestre y el mutante D382A en células BHK, Vero y A549. Tanto las células Vero como las células A549 son sensibles al IFN y lo producen, en respuesta a infecciones virales, de manera notable. Por el contrario, las células BHK-21 son incapaces de producir IFN en respuesta a infecciones virales.

Figura 5.7.2. (A) Título de los virus LCMV silvestre y el mutante para la NP D382A en células BHK-21 y BHK-21_{NP} a una Mdl de 0.01 UFP/cél. **(B)** Título viral de los virus LCMV silvestre y D382A en infecciones en células BHK-21, Vero y A549 a Mdl 0.1 UFP/cél. Las infecciones se realizaron tal y como se detalla en el apartado 4.4.1 de Materiales y métodos.

RESULTADOS

En todos los tipos celulares, la producción de progenie viral infecciosa del LCMV silvestre es mayor que la del mutante D382A (Figura 5.7.2B), lo que sugiere que la mutación D382A no afecta de manera notable a la actividad anti-IFN, ya que independientemente del tipo celular, y su capacidad de producción de IFN, el virus mutante vio disminuida su producción de progenie infecciosa.

5.7.4. Análisis genético del espectro de mutantes las poblaciones derivadas del mutante D382A

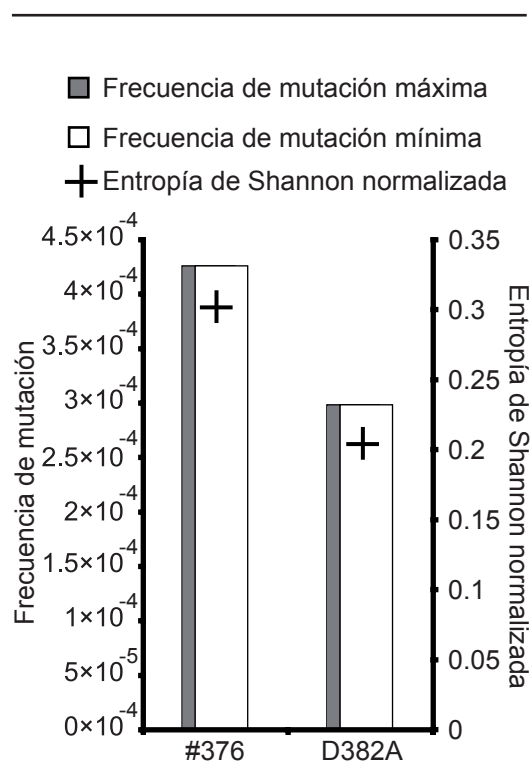


Figura 5.7.3. Complejidad de las cuasiespecies de LCMV silvestre y del mutante D382A resultantes de infecciones en células BHK-21. Las frecuencias de mutación y entropía de Shannon normalizada se determinaron de acuerdo a lo descrito en el apartado 4.15 de Materiales y métodos.

Para analizar la complejidad de la cuasiespecies de las poblaciones del mutante D382A, se analizaron las frecuencias de mutación (máxima y mínima) y la entropía de Shannon normalizada (Figura 5.7.3) de las poblaciones resultantes de las infecciones con el virus D382Ap1 y el virus silvestre en células BHK-21, infectando a una Mdi de 0.01 UFP/cél, transcurridas 48 hpi. Los resultados indican que la mutación D382A no induce un aumento de la frecuencia de mutación o la entropía de Shannon sino, más bien, un descenso (no significativo, $p=0.52$, χ^2 test) en dichos parámetros. No se observó ningún revertiente en ninguno de los 40 clones

analizados (procedentes de 2 poblaciones independientes) para el análisis genético, por lo que el enmascaramiento de la frecuencia de mutación producido por un revertiente temprano en el curso de la infección resulta improbable.

Dado el interés que tendría disponer de mutantes de fidelidad de copia estables para estudios poblacionales con LCMV, se han rescatado desde plásmidos los mutantes D459A, H517A, D522A, que participan en la reacción exonucleasa desarrollada por el dominio *Exo3'-5'*. Adicionalmente también se han obtenido los mutantes F387A, L452A, I5114A y E527A, que pertenecen al dominio *Exo3'-5'* pero no participan en la catálisis. La capacidad replicativa de estos mutantes se está estudiando, así como su estabilidad y complejidad de los espectros de mutantes que originan. En conclusión, se han obtenido mutantes de LCMV en la NP cuya fidelidad de copia durante la replicación podría encontrarse afectada. Estos mutantes serían una herramienta fundamental para estudiar el efecto de la tasa de error de Arenavirus en distintas propiedades abordadas en esta tesis doctoral: el efecto de la fidelidad en la producción de GDIs y su papel en la mutagénesis letal, la respuesta a Rib y la transición hacia la extinción, entre otros aspectos. Los resultados obtenidos han demostrado que los Arenavirus muestran interacciones biológicamente relevantes a nivel de sus espectros de mutantes y han proporcionado un sistema muy relevante en el abordaje del carácter mutagénico de la Rib y sus implicaciones en terapia.

“Ciencia es todo aquello sobre lo cual siempre cabe discusión”

José Ortega y Gasset (1883-1955)

Filósofo y ensayista español

6. Discusión

6.1. La baja carga viral favorece el efecto de la mutagénesis incrementada

La autointerferencia es un fenómeno común a gran cantidad de virus ARN de cadena negativa (Virus ARN(-)) (Domingo, E. 1989; Welsh, R. M. *et al.*, 1972; Popescu, M. *et al.*, 1976; Dutko, F. J. *et al.*, 1983). En este grupo de virus, en determinadas circunstancias, la presencia de GDIs interfiere con el ciclo viral del resto de genomas, alterando las propiedades de la población. La autointerferencia depende de la frecuencia con la que se generan GDIs en la población, así como de la frecuencia de coinfección de genomas silvestres y GDIs previamente generados (Ojosnegros, S. *et al.*, 2010; Easton, A. J. *et al.*, 2011; Moreno, H. *et al.*, 2012). Aunque han sido descritos con anterioridad GDIs, la naturaleza de estos en LCMV no está clara, y sólo en algunos casos se han conseguido evidencias directas de su presencia y participación en la dinámica poblacional.

En virus ARN(+) la frecuencia de este tipo de interacciones entre GDIs y virus silvestre parece mucho menor, aunque también se han descrito ARN interferentes en virus como FMDV (Charpentier, N. *et al.*, 1996; García-Arriaza, J. *et al.*, 2004; García-Arriaza, J. *et al.*, 2005), EMCV (Radloff, R. J. *et al.*, 1983) y PV (Song, Y. *et al.*, 2012). Quizás por el bajo nivel de interferencia basal, se obtuvo una dramática interferencia usando poblaciones altamente mutagenizadas de FMDV (González-López, C. *et al.*, 2004; González-López, C. *et al.*, 2005), un grupo de experimentos que sirvió de apoyo al modelo de defección letal (Grande-Pérez, A. *et al.*, 2005b)

DISCUSIÓN

LCMV presenta autointerferencia en infecciones realizadas en células BHK-21 a MdI superiores a 1 UFP/cél, inhibiéndose el título y el ARN viral (Figuras 5.1 y 5.3.1). En infecciones realizadas con LCMV, la carga viral inicial (MdI) determina el efecto de drogas como el FU o la Rib (Figuras 5.3.1. y 5.5.1.1) (Moreno, H. *et al.*, 2011; Moreno, H. *et al.*, 2012), siendo más sensibles a estas drogas aquellos virus que replican con una menor MdI. El fenómeno que subyace a esta observación no es común a todos los virus ARN. Los resultados obtenidos indican que mientras que virus ARN(-) muestran una clara relación entre el efecto inhibitorio de un mutágeno con la MdI utilizada, reflejándose en cambios en la complejidad de las cuasiespecies y la producción viral, los virus ARN(+) no presentan el mismo comportamiento frente al mismo tipo de drogas. En presencia de FU, tanto VSV como LCMV, muestran una mayor complejidad en el espectro de mutantes en las infecciones a MdI de 0.01 UFP/cél que en aquellas realizadas a MdI de 10 UFP/cél. Las similitudes entre ambos virus, sugieren que la inhibición observada sobre el título viral podía estar motivada por un incremento en la complejidad del espectro de mutantes y un descenso de la infectividad específica que sugiere la participación de GDIs.

En infecciones a baja MdI (inferior a 1 UFP/cél) los fenómenos de coinfección y reinfección (Figura 5.4) son muy escasos y los posibles GDIs generados durante la primera ronda de replicación, capaces de coinfectar células *naïve*, son muy poco numerosos. En consecuencia, el efecto autointerferente ejercido inicialmente por la presencia de GDI es reducido, y la replicación viral no se ve afectada, al menos a tiempos cortos. En esta situación, el FU ejerce un gran efecto mutagénico y antiviral. En infecciones a MdI elevadas (mayores a 1 UFP/cél), el sistema puede estar inhibido por la presencia de GDIs en el inóculo inicial, que disminuyen la replicación viral desde el inicio de la infección y, por tanto el efecto mutagénico ejercido por el FU es menor. Los resultados que indican un aumento de la complejidad de la cuasiespecies en virus ARN(-) y el efecto de mutágenos en función de la MdI son coheren-

tes con datos previamente descritos que fundamentan que la baja carga viral favorece la extinción de virus (Sierra, S. *et al.*, 2000; Moreno, H. *et al.*, 2012; Perales, C. *et al.*, 2011). En colaboración con el Dr. Héctor Tejero (Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad Complutense de Madrid), se amplió un modelo teórico de defección letal desarrollado por la Dra. Susanna Manrubia, que respalda y mimetiza los fenómenos observados experimentalmente en esta tesis y otros descritos anteriormente (Manrubia, S. C. *et al.*, 2005; Moreno, H. *et al.*, 2012).

La presencia de GDIs en una población viral es un parámetro importante al considerar la respuesta de la misma al efecto de drogas antivirales. Los GDIs inhiben la replicación viral y participan en defección letal por lo que el enriquecimiento de GDIs en una población podría contribuir a la extinción del virus silvestre. Por ello, el uso de administración multidroga (de manera combinada o secuencial) abren un amplio campo de estudio a desarrollar para implementar el efecto de drogas mutagénicas en tratamientos antivirales, teniendo en cuenta tanto el efecto de GDIs como las interacciones entre mutágenos e inhibidores. Estos estudios se están llevando a cabo actualmente en nuestro laboratorio (Perales, C., *et al.*, 2009; Iranzo, J., *et al.*, 2011).

6.2. La ribavirina presenta un efecto dual como mutágeno e inhibidor de la replicación de LCMV

La Rib es un agente antiviral de amplio espectro (Crotty, S. *et al.*, 2001; Lanford, R. E. *et al.*, 2001; Contreras, A. M. *et al.*, 2002; Severson, W. E. *et al.*, 2003; Sierra, M. *et al.*, 2007; Graci, J. D. *et al.*, 2008; Agudo, R. *et al.*, 2010b) (Tabla 2.2) aunque el mecanismo por el que ejerce dicho efecto en cada virus resulta en la mayor parte de los casos una incógnita (Crotty, S. *et al.*, 2002; Day, C. W. *et al.*, 2005; Cuevas, J. M. *et al.*, 2009; Moreno, H. *et al.*, 2011; Paeshuyse, J. *et al.*, 2011; Stevenson, N. J. *et al.*, 2011).

DISCUSIÓN

Los experimentos realizados en esta tesis doctoral con LCMV en presencia de diferentes concentraciones de Rib sugieren que esta droga ejerce su efecto antiviral en cultivos celulares, al menos, por dos mecanismos. A bajas concentraciones (inferiores a 60 μM) la Rib se comporta como un agente mutagénico, incrementando la complejidad del espectro de mutantes con abundancia de transiciones G \rightarrow A y C \rightarrow U, características de la mutagénesis por Rib. Posiblemente dicho efecto se produzca por la incorporación de la Rib a la cadena de ARN viral de nueva síntesis, mediada por la polimerasa viral, tal y como sucede en otros sistemas virales (Crotty, S. *et al.*, 2000; Crotty, S. *et al.*, 2001; Lanford, R. E. *et al.*, 2001; Airaksinen, A. *et al.*, 2003; Graci, J. D. *et al.*, 2008; Agudo, R. *et al.*, 2010b). A elevadas concentraciones (60 μM y superiores), la Rib se comporta como un inhibidor de la replicación, sin incrementar la complejidad del espectro de mutantes. Mientras que en infecciones realizadas en presencia de 20 μM de Rib se observa una bajada de producción de progenie viral moderada y un descenso en la cantidad de ARN viral muy atenuado, en infecciones realizadas en presencia de 60 μM y mayores, tanto la bajada de título viral como los descensos en cantidad de ARN viral son muy acentuados (Figura 5.5.1.2). Por tanto, mientras que a concentraciones próximas a 20 μM la Rib se comporta principalmente como un agente mutagénico, a concentraciones iguales o superiores a 60 μM , lo hace como inhibidor de la replicación viral.

El descenso de la infectividad específica en poblaciones tratadas con 100 μM Rib sugiere que la inhibición ejercida por la droga en estas condiciones podría estar producida por entrada en catástrofe de error. Sin embargo, las frecuencias de mutación y entropía de Shannon normalizada observadas en ausencia y presencia de concentraciones inhibitorias de Rib son muy similares (diferencias no significativas). En caso de que la inhibición ejercida por 100 μM de Rib fuese debida a entrada en catástrofe de error no sería posible, aún realizando un pase en ausencia de droga, recuperar el título viral. Sin embargo, tanto en infecciones realizadas en presencia de 20 como de 100 μM Rib, un segundo pase en ausencia de droga permite recuperar el título viral

más de 4 logaritmos (Figura 5.5.2), lo que sugiere que 100 μ M de Rib ejercen un efecto inhibitorio sobre la replicación de LCMV, que no es consecuencia de una acción mutagénica. Los experimentos para la resolución de esta cuestión están en curso.

La presencia de 100 μ M de G en el medio de cultivo en infecciones con LCMV revierte tanto la inhibición ejercida sobre la producción de progenie infecciosa y de ARN viral como el aumento de la complejidad del espectro de mutantes producido por 20 μ M de Rib (Figura 5.5.3). Dadas las similitudes estructurales entre la Rib y la G, la reversión ejercida por la G durante infecciones en presencia de Rib podría deberse a un desbalance del nivel G / Rib al incrementar la concentración de G, produciendo una disminución de la dosis efectiva de Rib. Esto sugiere, de nuevo, que el efecto antiviral de la Rib 20 μ M se debe principalmente a mutagénesis incrementada. Los resultados obtenidos en infecciones en presencia de 100 μ M de Rib en ausencia y presencia de 100 μ M de G sugieren que el efecto antiviral ejercido por la Rib a estas concentraciones está producido por la combinación de la inhibición sobre la replicación y la mutagénesis incrementada, ya que la presencia de 100 μ M de G y 100 μ M de Rib restablece sólo parcialmente el título y la cantidad de ARN viral (Figura 5.5.3). La presencia de G en infecciones en presencia de 100 μ M de Rib produce un incremento significativo de la frecuencia de mutación en las cuasiespecies analizadas, respecto a las infecciones realizadas en presencia únicamente de 100 μ M de Rib. Por tanto, los datos sugieren que la presencia de G revierte el efecto inhibitorio de la Rib en la producción de ARN viral (Figuras 5.5.3), permitiendo que la Rib ejerza cierto efecto mutagénico (Figuras 5.5.4.1 y 5.5.4.2) reflejado en un aumento de las frecuencias de mutación específicas características de la Rib (G \rightarrow A y C \rightarrow U) (Figura 5.5.4.2). En análisis más profundos de las poblaciones resultantes de infecciones realizadas en presencia de G y altas concentraciones de Rib podría aportar información sobre el mecanismo antiviral de la Rib a elevadas concentraciones.

DISCUSIÓN

Se han descrito dos mecanismos por los que la Rib puede ejercer su efecto mutagénico en virus ARN: i) Por incorporación del RTP a la cadena de ARN viral en síntesis y ii) por el desbalance de nucleótidos producidos por la inhibición de la *IMPDH* por la RMP, que podría conllevar la incorporación de nucleótidos incorrectos durante la replicación viral. Los resultados obtenidos en la presente tesis doctoral en infecciones de células BHK-21 con LCMV en ausencia y presencia de AMF, en comparación con las realizadas en presencia de Rib 20 μ M, indican que, la Rib, pero no el AMF, resulta mutagénica para LCMV, dado que ambos compuestos son inhibidores de la *IMPDH* y se diferencian en su capacidad para ser incorporados o no al ARN. Los resultados descartan que la inhibición de la *IMPDH* por la RMP sea responsable principal del efecto mutagénico de la droga. En otros virus ARN, i) ha sido descrito como el mecanismo para la mutagénesis incrementada por Rib (Crotty, S. *et al.*, 2000; Crotty, S. *et al.*, 2001; Lanford, R. E. *et al.*, 2001; Airaksinen, A. *et al.*, 2003; Graci, J. D. *et al.*, 2008; Agudo, R. *et al.*, 2010b). Aunque los conocimientos actuales no permiten obtener datos bioquímicos sobre la incorporación de RTP por la polimerasa de LCMV *in vitro*, los resultados presentados en esta tesis doctoral sugieren que el mecanismo i) también es el principal candidato para explicar la mutagénesis incrementada en LCMV. Experimentos adicionales para profundizar en el mecanismo de acción de la Rib sobre Arenavirus están actualmente en curso.

Como parte del trabajo de esta tesis doctoral realizado en el TSRI (La Jolla, CA, USA), se comparó el comportamiento de una nueva droga denominada ST-545 con el de la Rib. Esta droga había resultado tener un efecto antiviral en LCMV pero no en LSV en estudios anteriores no publicados. Aunque la droga muestra estrechas similitudes con la Rib, al no disponer de su estructura química (propiedad intelectual de SIGA y de TSRI, La Jolla) resultó imposible una completa interpretación de los resultados obtenidos, por lo que se han excluido de la presente tesis doctoral.

La dualidad del efecto antiviral de la Rib en LCMV como mutágeno e inhibidor abre interesantes interrogantes, que se han sugerido en los Resultados. El efecto inhibitorio podría ser independiente del efecto mutagénico, tal y como se documentó, por ejemplo, con el FU actuando sobre FMDV. En este caso la FUTP puede incorporarse al ARN viral durante su elongación, pero también incorporarse a la VPg durante la iniciación de la síntesis de ARN, bloqueando la siguiente incorporación de nucleótidos (Agudo, R. *et al.*, 2008; Agudo, R. *et al.*, 2009). No podemos descartar que la Rib o alguno de sus derivados ejerza alguna acción inhibitoria sobre la maquinaria replicativa de LCMV. Los experimentos realizados al pasar el virus en ausencia y presencia de 20 y 100 μM de Rib (Figura 5.5.2) sugieren que la inhibición ejercida por 100 μM Rib no es consecuencia de mutagénesis letal. Es posible suponer que los efectos mutagénico e inhibitorio serían aditivos en LCMV, aunque la inhibición sobre la replicación enmascare el efecto mutagénico (Figura 5.5.4.1). Por esta razón, la concentración de Rib usada en combinación con otros agentes antivirales debe ser considerada, ya que el efecto antiviral neto de la combinación puede resultar menor que el ejercido por las drogas empleadas por separado.

6.3. Efecto antiviral sinérgico entre ribavirina y 5-fluorouracilo en la administración secuencial en LCMV

En virus ARN, las terapias antivirales multidroga (o también denominadas terapias de combinación) han demostrado, tanto en pacientes como en sistemas modelo de cultivos celulares, ser eficaces reduciendo la carga viral y evitando o retrasando la aparición de mutantes resistentes a los antivirales (Domingo, E., 1989; Pianko, S. *et al.*, 2000; Medina, J. *et al.*, 2003; Perales, C. *et al.*, 2009). Por ejemplo, en las infecciones por HCV el tratamiento de elección es la combinación de IFNp y Rib (Health, N. I., *et al.*, 2011), aunque la combinación con otros agentes antivirales (DAAs, de las siglas en inglés

DISCUSIÓN

Direct Acting Antiviral agents) abre un nuevo abanico de posibilidades. Para HIV-1 existe un compendio de antivirales (principalmente análogos de nucleósidos, inhibidores de la retrotranscriptasa y de la proteasa viral) con distintas combinaciones indicadas según los casos a tratar (No-Authors, 1996). Para virus de ARN, en general, los tratamientos combinados cobran una particular importancia a causa de la gran velocidad de evolución y adaptación a nuevos ambientes de la población viral, incluida la capacidad de selección de mutantes de escape resistentes a drogas (Domingo, E., 1989; Domingo, E. *et al.*, 2010). La naturaleza y efecto de las drogas empleadas (particularmente su carácter inhibitorio o mutagénico) condiciona la composición y complejidad de los espectros de mutantes y por ende la eficacia de la terapia.

La baja carga viral aumenta la sensibilidad de LCMV frente a mutágenos y favorece la extinción (Sierra, S. *et al.*, 2000; Moreno, H. *et al.*, 2012). Los resultados obtenidos indican que la bajada inicial del título viral producida por la Rib a concentraciones inhibitorias de la replicación viral (60 μM y superiores) potencia el efecto mutagénico del FU, disminuyendo la producción de progenie infecciosa y aumentando la complejidad del espectro de mutantes (Figuras 5.6.3.1 y 5.6.3.2). En la terapia secuencial, el sesgo mutacional observado es consecuencia de la superposición de las mutaciones características producidas por la Rib y el FU. Este sesgo es, además, más acentuado cuando se emplea 60 μM de Rib, originando una mayor complejidad del espectro de mutantes.

En todos los casos estudiados con LCMV, la combinación de Rib y FU produjo menor inhibición del título viral que las mismas concentraciones de droga administradas en combinación, evidenciando interacciones entre ambos fármacos, de modo análogo a resultados obtenidos en FMDV (Iranzo, J. *et al.*, 2011). La separación en el tiempo del empleo de ambas drogas evita dichas interacciones y, en consecuencia, posibilita un mayor efecto antiviral de la terapia.

En LCMV, las mutaciones mayoritariamente producidas por el FU son A→G y U→C (Grande-Pérez, A. *et al.*, 2002; Grande-Pérez, A. *et al.*, 2005a; Grande-Pérez, A. *et al.*, 2005b; Martin, V. *et al.*, 2010; Moreno, H. *et al.*, 2012), y las producidas por la Rib son justamente las contrarias (G→A y C→U) (Moreno, H. *et al.*, 2011). La interacción observada entre Rib y FU en las terapias de combinación no parece ser debida a la reversión de las mutaciones ocasionadas por uno y otro fármaco. La posibilidad de que, dada una determinada posición, ocurra una mutación seguida de una reversión y que ambos fenómenos produzcan la reversión genotípica en el caso más probable (La probabilidad de la mutación y posterior reversión A→G→A es el producto de las frecuencias de mutación específicas $F_{\text{mut FU A-G}} \times F_{\text{mut Rib G-A}}$) es inferior a 3/100000. Por tanto, a pesar de que la reversión puede ser más evidente en posiciones que afectan severamente la eficacia viral, consideramos improbable que se contrarreste la acción de ambos mutágenos. Además, esta compensación estaría más acentuada en el caso de la administración sucesiva, dando lugar a una menor complejidad en la cuasiespecie, lo que es contrario de lo que señalan los resultados experimentales (Figuras 5.6.3.1 y 5.6.3.2)

En general, la eficacia de la terapia combinada o secuencial dependerá en gran medida de la naturaleza de los fármacos empleados, en particular si se trata de inhibidores o mutágenos. En la presente tesis doctoral se demuestra una mayor eficacia del protocolo secuencial (inhibidor→mutágeno) frente a cualquiera de los demás formatos en el tratamiento de infecciones causadas por LCMV, lo que coincide con datos previos con FMDV (Perales, C. *et al.*, 2009; Iranzo, J. *et al.*, 2011) y por tanto los resultados podrían ser extrapolables a otros virus ARN sujetos a la dinámica de cuasiespecies.

6.4. El dominio DH-D-D de la nucleoproteína de LCMV es importante para la viabilidad de LCMV

En la familia Arenaviridae la NP está codificada en el segmento S del genoma de LCMV en polaridad negativa, por lo que es necesaria la participación de L para la obtención los ARN antígenómicos y mensajeros virales. Gracias a la reciente resolución de la estructura tridimensional de la NP en LSV se determinó su interacción con ARN de doble cadena (ARN_{2c}), la función anti-IFN y un dominio *Exo3'-5'* cuyo papel en el ciclo viral todavía se desconocen. Las mismas funciones se han descrito también para la NP de LCMV y parecen comunes a todos los Arenavirus. La función anti-IFN en LCMV Clon13 permite establecer una infección persistente en ratón, a diferencia de LCMV Arm53, que no tiene esta función y que es eliminado por el sistema inmune del hospedador pasados entre 7 y 10 días desde la infección. El dominio *Exo3'-5'* presente en la proteína NP de los Arenavirus pertenece a la superfamilias de exonucleasa DEDD. El dominio *Exo3'-5'* de la familia Arenaviridae tiene en su sitio activo los residuos DHDD, y es la His en lugar del Glu el residuo que marca la diferencia con el resto de la superfamilia de exonucleasas.

En los virus del género Coronavirus, la proteína Nsp14 posee un dominio *Exo3'-5'* con actividad correctora de errores y cuya mutación produce un incremento de 15 veces en la frecuencia de mutación respecto al virus silvestre (Denison, M. R. *et al.*, 2011; Hastie, K. M. *et al.*, 2011a; Hastie, K. M. *et al.*, 2011b). Con estos precedentes, si el dominio *Exo3'-5'* de la NP de LCMV participaba en el mantenimiento de las tasas de error propias de virus ARN dentro de los límites permisivos para el mantenimiento de la información, la alteración de la funcionalidad del mismo y el efecto sobre la población viral aportarían información para el mejor entendimiento de la dinámica de cuasiespecies. Para determinar el efecto que producían las mutaciones en el sitio activo de la *Exo3'-5'* en LCMV se obtuvieron varios mutantes de la NP

por genética reversa que afectan bien al sitio catalítico del dominio *Exo3'-5'* (D382A, D459A, H517A y D522A), bien al putativo dominio *Exo3'-5'* de la NP, sin pertenecer al sitio catalítico (F387A, L452A, I5114A y E527A), aunque sólo se presentan los resultados del mutante D382A. La rápida reversión del mutante D382A acompañada con una posterior recuperación del título viral indica que la función afectada es de gran importancia para la biología del virus. Dado que el comportamiento del mutante D382A (en comparación con el virus silvestre) entre los diferentes tipos celulares competentes y no competentes en la producción de IFN (Figura 5.7.2B) es muy similar, se sugiere que esta mutación no afectaba a la capacidad anti-IFN del virus. Por otro lado, la complejidad del espectro de mutantes del pase 1 del mutante D382A (en la que se había confirmado la no reversión) no se incrementó como consecuencia de dicha mutación (Figura 5.7.3). Tanto los estudios adicionales con el mutante D382A como con el resto de mutantes preparados resultan necesarios para determinar si el dominio *Exo3'-5'* está involucrado en una actividad correctora de errores, lo que constituiría una gran herramienta para el estudio de cuasiespecies en LCMV.

CONCLUSIONES

“Conclusión es el lugar donde llegaste cansado de pensar.”

Anónimo

7. Conclusiones / Conclusions

7.1. La inhibición de la producción de progenie de LCMV por el 5-fluorouracilo es mayor en infecciones a baja multiplicidad de infección. Cuanto mayor es la inhibición, mayor es el aumento de la complejidad de la cuasiespecies.

The inhibition exerted by the 5-fluorouracil in the infectious progeny production is higher at low multiplicity of infection. Greater is the exerted inhibition, greater is the increase in the quasispecies complexity.

7.2. La correlación entre la inhibición ejercida por el 5-fluorouracilo y la multiplicidad de infección se observa también en VSV, pero no con EMCV o FMDV.

VSV, but not EMCV or FMDV, shares the observed correlation between the inhibition exerted by the 5-fluorouracil and the multiplicity of infection.

7.3. La ribavirina es mutagénica para LCMV a bajas concentraciones, e inhibitoria de la replicación a altas concentraciones.

The ribavirin exerts a mutagenic effect at low concentrations, and is inhibitory of the replication at higher concentrations.

CONCLUSIONES

7.4. La administración secuencial ribavirina→5-fluorouracilo, empleando concentraciones inhibitorias de ribavirina, es más eficaz para inhibir la producción de progenie infecciosa de LCMV que la administración de cada droga por separado o la combinación de ambas. La inhibición ejercida se correlaciona directamente con la complejidad del espectro de mutantes.

The sequential administration ribavirina→5-fluoruracil, using replication inhibitory concentrations of ribavirin, results in a stronger inhibition in the infectious progeny production, contrary to the combined administration or administration of both drugs separately. The exerted inhibition correlates with complexity of the mutant spectrum.

7.5. Se han obtenido mutantes en el dominio exonucleasa 3'-5' de la nucleoproteína de LCMV para investigar su posible efecto en la fidelidad de copia durante la replicación viral.

NP exonuclease 3'-5' domain mutants have been obtained to investigate the effect in copy fidelity during viral replication.

“La Ciencia maduró en esta biblioteca”

Carl Sagan (1934-1996)

Astrónomo y astrofísico, estadounidense.

8. Bibliografía

Agol, V. I. (2006). Molecular mechanisms of poliovirus variation and evolution. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 299, 211-59.

Agudo, R., Arias, A., Pariente, N., Perales, C., Escarmis, C., Jorge, A., Marina, A., and Domingo, E. (2008). Molecular characterization of a dual inhibitory and mutagenic activity of 5-fluorouridine triphosphate on viral rna synthesis. Implications for lethal mutagenesis. *J Mol Biol* 382(3), 652-66.

Agudo, R., Arias, A., and Domingo, E. (2009). 5-fluorouracil in lethal mutagenesis of foot-and-mouth disease virus. *Future Med. Chem.* 1(11), 529-539.

Agudo, R., Arias, A., and Domingo, E. (2010a). Implication of picornaviral protein 2c in genome miscopying pattern: A new lethal mutagenesis-escape mechanism. *PLoS Pathog* 6(8), e1001072.

Agudo, R., Ferrer-Orta, C., Arias, A., de la Higuera, I., Perales, C., Perez-Luque, R., Verdaguer, N., and Domingo, E. (2010b). A multi-step process of viral adaptation to a mutagenic nucleoside analogue by modulation of transition types leads to extinction-escape. *PLoS Pathog* 6(8), e1001072.

Airaksinen, A., Pariente, N., Menendez-Arias, L., and Domingo, E. (2003). Curing of foot-and-mouth disease virus from persistently infected cells by ribavirin involves enhanced mutagenesis. *Virology* 311(2), 339-49.

Alcami, A. (2003). Viral mimicry of cytokines, chemokines and their receptors. *Nat. Rev. Immunol.* 3(1), 36-50.

Anhlan, D., Hrincius, E. R., Scholtissek, C., and Ludwig, S. (2012). Introduction of silent mutations into the np gene of influenza a viruses as a possible strategy for the creation of a live attenuated vaccine. *Vaccine* 30(30), 4480-4489.

Arias, A., Lázaro, E., Escarmís, C., and Domingo, E. (2001). Molecular intermediates of fitness gain of an rna virus: Characterization of a mutant spectrum by biological and molecular cloning. *J. Gen. Virol.* 82(Pt 5), 1049-60.

BIBLIOGRAFÍA

Arias, A., Arnold, J. J., Sierra, M., Smidansky, E. D., Domingo, E., and Cameron, C. E. (2008). Determinants of rna-dependent rna polymerase (in) fidelity revealed by kinetic analysis of the polymerase encoded by a foot-and-mouth disease virus mutant with reduced sensitivity to ribavirin. *J Virol* 82(24), 12346-55.

Asahina, Y., Izumi, N., Enomoto, N., Uchihara, M., Kurosaki, M., Onuki, Y., Nishimura, Y., Ueda, K., Tsuchiya, K., Nakanishi, H., Kitamura, T., and Miyake, S. (2005). Mutagenic effects of ribavirin and response to interferon/ribavirin combination therapy in chronic hepatitis c. *J. Hepatol.* 43(4), 623-9.

Ayrosa-Galvão, P. A., and Castro, I. O. (1977). The effect of 1-beta-d-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide on acute viral hepatitis. *Ann N Y Acad Sci.* 284, 278-283.

Balzarini, J., Karlsson, A., Wang, L., Bohman, C., Horská, K., Votruba, I., Fridland, A., Van Aerschot, A., Herdewijn, P., and De Clercq, E. (1993). Eicar (5-ethynyl-1-beta-d-ribofuranosylimidazole-4-carboxamide). A novel potent inhibitor of inosinate dehydrogenase activity and guanylate biosynthesis. *J Biol Chem.* 268(33), 24591-24598.

Baranowski, E., Sevilla, N., Verdaguer, N., Ruíz-Jarabo, C. M., Beck, E., and Domingo, E. (1998). Multiple virulence determinants of foot-and-mouth disease virus in cell culture. *J. Virol.* 72(8), 6362-6372.

Baranowski, E., Ruiz-Jarabo, C. M., and Domingo, E. (2001). Evolution of cell recognition by viruses. *Science* 292(5519), 1102-5.

Baranowski, E., Ruiz-Jarabo, C. M., Pariente, N., Verdaguer, N., and Domingo, E. (2003). Evolution of cell recognition by viruses: A source of biological novelty with medical implications. *Adv Virus Res* 62, 19-111.

Barton, L. L. (1996). Lymphocytic choriomeningitis virus: A neglected central nervous system pathogen. *Clin Infect Dis* 22(1), 197.

Bartzatt, R., and Anderson, G. A. (1989). Ribavirin inhibits proliferation of bovine respiratory syncytial virus in vitro. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 12(3), 57-62.

Batschelet, E., Domingo, E., and Weissmann, C. (1976). The proportion of revertant and mutant phage in a growing population, as a function of mutation and growth rate. *Gene* 1(1), 27-32.

Bausch, D. G., Hadi, C. M., Khan, S. H., and Lertora, J. J. L. (2010). Review of the literature and proposed guidelines for the use of oral ribavirin as post-exposure prophylaxis for lassa fever. *Clinical Infectious Diseases* 51, 1435-1441.

- Benarroch, D., Egloff, M. P., Mulard, L., Guerreiro, C., Romette, J. L., and Canard, B. (2004). A structural basis for the inhibition of the ns5 dengue virus mrna 2'-o-methyltransferase domain by ribavirin 5'-triphosphate. *J Biol Chem.* 279(34), 35638-35643.
- Bergelson, J. M. (2003). Virus interactions with mucosal surfaces: Alternative receptors, alternative pathways. *Curr. Opin. Microbiol.* 6(4), 386-91.
- Bernad, A., Blanco, L., Lazaro, J. M., Martin, G., and Salas, M. (1989). A conserved 3'-5' exonuclease active site in prokaryotic and eukaryotic DNA polymerases. *Cell* 59(1), 219-28.
- Biebricher, C. K., and Domingo, E. (2006a). The advantage of the high genetic diversity in rna viruses. *Future Virology*, in press.
- Biebricher, C. K., and Eigen, M. (2006b). What is a quasispecies? *Current Topics in Microbiol. and Immunol.* 299, 1-31.
- Borderia, A. V., Lorenzo-Redondo, R., Pernas, M., Casado, C., Alvaro, T., Domingo, E., and Lopez-Galindez, C. (2010). Initial fitness recovery of hiv-1 is associated with quasispecies heterogeneity and can occur without modifications in the consensus sequence. *PLoS One* 5(4), e10319.
- Borrego, B., Novella, I. S., Giralt, E., Andreu, D., and Domingo, E. (1993). Distinct repertoire of antigenic variants of foot-and-mouth disease virus in the presence or absence of immune selection. *J. Virol.* 67(10), 6071-6079.
- Bougie, I., and Bisailon, M. (2004). The broad spectrum antiviral nucleoside ribavirin as a substrate for a viral rna *capping* enzyme. *J Biol Chem.* 279(21), 22124-22130.
- Brook, G., Main, J., Nelson, M., Bhagani, S., Wilkins, E., Leen, C., Fisher, M., Gilleece, Y., Gilson, R., Freedman, A., Kulasegaram, R., Agarwal, K., Sabin, C., and Deacon-Adams, C. (2010). British hiv association guidelines for the management of coinfection with hiv-1 and hepatitis b or c virus 2010. *HIV Medicine* 11, 1-30.
- Brunotte, L., Kerber, R., Shang, W., Hauer, F., Hass, M., Gabriel, M., Lelke, M., Busch, C., Stark, H., Svergun, D. I., Betzel, C., Perbandt, M., and Günther, S. (2011a). Structure of the lassa virus nucleoprotein revealed by x-ray crystallography, small-angle x-ray scattering, and electron microscopy. *J Biol Chem.* 286(44), 38748-38756.
- Brunotte, L., Lelke, M., Hass, M., Kleinstaub, K., Becker-Ziaja, B., and Günther, S. (2011b). Domain structure of lassa virus l protein. *J Virol* 85(1), 324-333.

BIBLIOGRAFÍA

Buenz, E. J., and Howe, C. L. (2006). Picornaviruses and cell death. *TRENDS in Microbiology* 14(1), 28-36.

Burri, D. J., Pasqual, G., Rochat, C., Seidah, N. G., Pasquato, A., and Kunz, S. (2012). Molecular characterization of the processing of arenavirus envelope glycoprotein precursors by subtilisin kexin isozyme-1/site-1 protease. *J Virol* 86(9), 4935-4946.

Campbell Dwyer, E. J., Lai, H., MacDonald, R. C., Salvato, M. S., and Borden, K. (2000). The lymphocytic choriomeningitis virus ring protein z associates with eukaryotic initiation factor 4e and selectively represses translation in a ring-dependent manner. *J. Virol.* 74, 3293–3300.

Caplen, H., Peters, C. J., and Bishop, D. H. (1985). Mutagen-directed attenuation of rift valley fever virus as a method for vaccine development. *J. Gen. Virol.* 66(Pt 10), 2271-7.

Capul, A. A., de la Torre, J. C., and Buchmeier, M. J. (2012). Conserved residues in lassa fever virus z protein modulate viral infectivity at the level of the ribonucleoprotein. *J Virol* 85(7), 3172-3178.

Carman, W., Thomas, H., and Domingo, E. (1993). Viral genetic variation: Hepatitis b virus as a clinical example. *Lancet* 341(8841), 349-353.

Carrico, C. K., and Glazer, R. I. (1979). Effect of 5-fluorouracil on the synthesis and translation of polyadenylic acid-containing rna from regenerating rat liver. *Cancer Res.* 39(9), 3694-3701.

Charpentier, N., Davila, M., Domingo, E., and Escarmis, C. (1996). Long-term, large-population passage of aphthovirus can generate and amplify defective noninterfering particles deleted in the leader protease gene. *Virology* 223(1), 10-8.

Charpentier, C., Dwyer, D. E., Mammano, F., Lecossier, D., Clavel, F., and Hance, A. J. (2004). Role of minority populations of human immunodeficiency virus type 1 in the evolution of viral resistance to protease inhibitors. *J. Virol.* 78(8), 4234-47.

Charrel, R. N., and de Lamballerie, X. (2010). Zoonotic aspects of arenavirus infections. *Vet Microbiol* 140(3-4), 213-20.

Chevaliez, S., Brillet, R., Lazaro, E., Hezode, C., and Pawlotsky, J. M. (2007). Analysis of ribavirin mutagenicity in human hepatitis c virus infection. *J Virol* 81(14), 7732-41.

Chung, D. H., Sun, Y., Parker, W. B., Arterburn, J. B., Bartolucci, A., and Jonsson, C. B. (2007). Ribavirin reveals a lethal threshold of allowable mutation frequency for hantaan virus. *J Virol* 81(21), 11722-9.

Contreras, A. M., Hiasa, Y., He, W., Terella, A., Schmidt, E. V., and Chung, R. T. (2002). Viral rna mutations are region specific and increased by ribavirin in a full-length hepatitis c virus replication system. *J. Virol.* 76(17), 8505-17.

Cooper, P. D. (1964). The mutation of poliovirus by 5-fluorouracil. *Virology* 22, 186-92.

Cornu, T. I., Feldmann, H., and de la Torre, J. C. (2004). Cells expressing the ring finger z protein are resistant to arenavirus infection. *J Virol.* 78(6), 2979-2983.

Crance, J. M., Gratier, D., Guimet, J., and Jouan, A. (1997). Inhibition of sandfly fever sicilian virus (phlebovirus) replication in vitro by antiviral compounds. *Res Virol.* 148(5), 353-365.

Crance, J. M., Scaramozzino, N., Jouan, A., and Garin, D. (2003). Interferon, ribavirin, 6-azauridine and glycyrrhizin: Antiviral compounds active against pathogenic flaviviruses. *Antiviral Res* 58(1), 73-79.

Crotty, S., Maag, D., Arnold, J. J., Zhong, W., Lau, J. Y. N., Hong, Z., Andino, R., and Cameron, C. E. (2000). The broad-spectrum antiviral ribonucleotide, ribavirin, is an rna virus mutagen. *Nature Medicine* 6, 1375-1379.

Crotty, S., Cameron, C. E., and Andino, R. (2001). Rna virus error catastrophe: Direct molecular test by using ribavirin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98(12), 6895-900.

Crotty, S., Cameron, C., and Andino, R. (2002). Ribavirin's antiviral mechanism of action: Lethal mutagenesis? *J. Mol. Med.* 80(2), 86-95.

Cuevas, J. M., Gonzalez-Candelas, F., Moya, A., and Sanjuan, R. (2009). Effect of ribavirin on the mutation rate and spectrum of hepatitis c virus in vivo. *J Virol* 83(11), 5760-4.

Davern, C. I., and Bonner, J. (1958). The influence of 5-fluorouracil on tobacco-mosaic virus production in tobacco-leaf discs. *Biochim Biophys Acta* 29(1), 205-6.

Day, C. W., Smee, D. F., Julander, J. G., Yamshchikov, V. F., Sidwell, R. W., and Morrey, J. D. (2005). Error-prone replication of west nile virus caused by ribavirin. *Antiviral Res.* 67(1), 38-45.

BIBLIOGRAFÍA

de la Torre, J. C., Alarcón, B., Martínez-Salas, E., Carrasco, L., and Domingo, E. (1987). Ribavirin cures cells of a persistent infection with foot-and-mouth disease virus in vitro. *J. Virol.* 61(1), 233-235.

de la Torre, J. C. (2005). Arenavirus extinction through lethal mutagenesis. *Virus Res* 107(2), 207-14.

Denison, M. R., Graham, R. L., Donaldson, E. F., Eckerle, L. D., and Baric, R. S. (2011). Coronaviruses: An rna proofreading machine regulates replication fidelity and diversity. *RNA Biol* 8(2), 270-279.

Dolnick, B. J., and Wu, X. P. (1993). Effects of 5-fluorouracil on mrna. *Adv Exp Med Biol.* 339, 57-63.

Domingo, E. (1989). Rna virus evolution and the control of viral disease. *Prog Drug Res* 33, 93-133.

Domingo, E. (2006). Quasispecies: Concepts and implications for virology. In *Curr Top Microbiol Immunol*. Vol, 299.

Domingo, E. (2007). Virus evolution. In: *Fields virology*. 5th ed (D.M. Knipe, P.M. Howley, and eds., Eds.), pp. 389-421, Lippincott Williams & Wilkins Philadelphia.

Domingo, E., Sabo, D., Taniguchi, T., and Weissmann, C. (1978). Nucleotide sequence heterogeneity of an rna phage population. *Cell* 13(4), 735-744.

Domingo, E., Davila, M., and Ortin, J. (1980). Nucleotide sequence heterogeneity of the rna from a natural population of foot-and-mouth-disease virus. *Gene* 11(3-4), 333-46.

Domingo, E., Mateu, M. G., Martínez, M. A., Dopazo, J., Moya, A., and Sobrino, F. (1990). Genetic variability and antigenic diversity of foot-and-mouth disease virus. In "Applied virology research" (E. Kurkstak, R. G. Marusyk, S. A. Murphy, and M. H. V. Van-Regenmortel, Eds.), Vol. 2, pp. 233-266. Plenum Publishing Co., New York.

Domingo, E., Menéndez-Arias, L., and Holland, J. J. (1997). Rna virus fitness. *Rev. Med. Virol.* 7(2), 87-96.

Domingo, E., Escarmís, C., Sevilla, N., and Baranowski, E. (1998). Population dynamics in the evolution of rna viruses. *Adv. Exp. Med. Biol.* 440, 721-727.

Domingo, E., Biebricher, C., Eigen, M., and Holland, J. J. (2001). Quasispecies and rna virus evolution: Principles and consequences. Landes Bioscience, Austin.

Domingo, E., Martin, V., Perales, C., Grande-Perez, A., Garcia-Arriaza, J., and Arias, A. (2006). Viruses as quasispecies: Biological implications. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 299, 51-82.

Domingo, E., and Gomez, J. (2007). Quasispecies and its impact on viral hepatitis. *Virus Res.*, 127: 131-150.

Domingo, E., Perales, C., Agudo, R., Arias, A., Ferrer-Orta, C., and Verdaguer, N. (2010). Mutation, quasispecies and lethal mutagenesis. In "The picornaviruses" (E. Ehrenfeld, E. Domingo, and R. P. Roos, Eds.), pp. 197-211. ASM Press, Washington, DC.

Domingo, E., Sheldon, J., and Perales, C. (2012). Viral quasispecies evolution. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, in press.

Doong, S. L., and Dolnick, B. J. (1988). 5-fluorouracil substitution alters premRNA splicing in vitro. *J Biol Chem.* 263(9), 4467-4473.

Dragun, M., Rada, B., Novotny, L., and Beranek, J. (1990). Antiviral activities of pyrimidine nucleoside analogues: Some structure--activity relationships. *Acta Virol.* 34(4), 321-9.

Drake, J. W. (1991). A constant rate of spontaneous mutation in DNA-based microbes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88(16), 7160-7164.

Dulbecco, R., and Freeman, G. (1959). Plaque production by the polyoma virus. *Virology* 8(3), 396-397.

Durr, F. E., and Lindh, H. F. (1975). Efficacy of ribavirin against influenza virus in tissue culture and in mice. *Ann N Y Acad Sci.* 255, 366-371.

Dutko, F. J., and Oldstone, M. B. A. (1983). Genomic and biologic variation among commonly used lymphocytic choriomeningitis virus strains. *J. Gen. Virol.* 64, 1689-1694.

Eastman, P. S., and Blair, C. D. (1985). Temperature-sensitive mutants of japanese encephalitis virus. *J. Virol.* 55(3), 611-616.

Easton, A. J., Scott, P. D., Edworthy, N. L., Meng, B., Marriott, A. C., and Dimmock, N. J. (2011). A novel broad-spectrum treatment for respiratory virus infections: Influenza-based defective interfering virus provides protection against pneumovirus infection in vivo. *Vaccine* 29, 2777-2784.

Echols, H., and Goodman, M. F. (1991). Fidelity mechanisms in DNA replication. *Annual Review of Biochemistry* 60, 477-511.

BIBLIOGRAFÍA

Eckerle, L. D., Lu, X., Sperry, S. M., Choi, L., and Denison, M. R. (2007). High fidelity of murine hepatitis virus replication is decreased in nsp14 exonuclease mutants. *J Virol* 81(22), 12135-44.

Eckerle, L. D., Becker, M. M., Halpin, R. A., Li, K., Venter, E., Lu, X., Scherbakova, S., Graham, R. L., Baric, R. S., Stockwell, T. B., Spiro, D. J., and Denison, M. R. (2010). Infidelity of sars-cov nsp14-exonuclease mutant virus replication is revealed by complete genome sequencing. *PLoS Pathog* 6(5), e1000896.

Eigen, M. (1971). Self-organization of matter and the evolution of biological macromolecules. *Naturwissenschaften* 58, 465-523.

Eigen, M., and Schuster, P. (1979). "The hypercycle. A principle of natural self-organization." Springer, Berlin.

Eigen, M., McCaskill, J., and Schuster, P. (1988a). Molecular quasi-species. *J. Phys. Chem.* 92, 6881-6891.

Eigen, M., and Biebricher, C. K. (1988b). Sequence space and quasispecies distribution. In "Rna genetics" (E. Domingo, P. Ahlquist, and J. J. Holland, Eds.), Vol. 3, pp. 211-245. Boca Raton, FL. CRC Press.

Eigen, M. (1993). Viral quasispecies. *Sci. Am.* 269(1), 42-9.

Eigen, M. (2002). Error catastrophe and antiviral strategy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99(21), 13374-6.

Emonet, S. F., Garidou, L., McGavern, D. B., and de la Torre, J. C. (2009). Generation of recombinant lymphocytic choriomeningitis viruses with trisegmented genomes stably expressing two additional genes of interest. *PNAS* 106(9), 3473-3478.

Enria, D. A., and Maiztegui, J. I. (1994). Antiviral treatment of argentine hemorrhagic fever. *Antiviral Res* 23(1), 23-31.

Escarmís, C., Lazaro, E., Arias, A., and Domingo, E. (2008). Repeated bottleneck transfers can lead to non-cytocidal forms of a cytopathic virus: Implications for viral extinction. *J. Mol. Biol.* 376(2), 367-79.

Fernandez-Larsson, R., O'Connell, K., Koumans, E., and Patterson, J. L. (1989). Molecular analysis of the inhibitory effect of phosphorylated ribavirin on the vesicular stomatitis virus in vitro polymerase reaction. *Antimicrob Agents Chemother* 33(10), 1668-73.

Ferrer-Orta, C., Sierra, M., Agudo, R., de la Higuera, I., Arias, A., Perez-Luque, R., Escarmis, C., Domingo, E., and Verdaguer, N. (2010). Structure of foot-and-mouth disease virus mutant polymerases with reduced sensitivity to ribavirin. *J Virol* 84(12), 6188-99.

Fisher-Hoch, S. P., Khan, J. A., Rehman, S., Mirza, S., Khurshid, M., and McCormick, J. B. (1995). Crimean congo-haemorrhagic fever treated with oral ribavirin. *The Lancet* 346(8973), 472-475.

Flatz, L., Bergthaler, A., de la Torre, J. C., and Pinschewer, D. D. (2006). Recovery of an arenavirus entirely from rna polymerase i/ii-driven cdna. *PNAS* 103(12), 4663-4668.

Frank, K. B., McKernan, P. A., Smith, R. A., and Smee, D. F. (1987). Visna virus as an in vitro model for human immunodeficiency virus and inhibition by ribavirin, phosphonoformate, and 2',3'-dideoxynucleosides. *Antimicrob Agents Chemother.* 31(9), 1369-1374.

Franklin, T. J., and Cook, J. M. (1969). The inhibition of nucleic acid synthesis by mycophenolic acid. *Biochem. J.* 113(3), 515-24.

Freistadt, M. S., Meades, G. D., and Cameron, C. E. (2004). Lethal mutagens: Broad-spectrum antivirals with limited potential for development of resistance? *Drug Resist Updat.* 7(1), 19-24.

Friedberg, E. C., Aguilera, A., Gellert, M., Hanawalt, P. C., Hays, J. B., Lehmann, A. R., Lindahl, T., Lowndes, N., Sarasin, A., and Wood, R. D. (2006). DNA repair: From molecular mechanism to human disease. *DNA Repair* 5(8), 986-996.

Fuller-Pace, F. V., and Southern, P. J. (1989). Detection of virus-specific rna-dependent rna polymerase activity in extracts from cells infected with lymphocytic choriomeningitis virus: In vitro synthesis of full-length viral rna species. *J Virol* 63(5), 1938-44.

Gallei, A., Pankraz, A., Thiel, H. J., and Becher, P. (2004). Rna recombination in vivo in the absence of viral replication. *J. Virol.* 78(12), 6271-81.

Gallois-Montbrun, S., Chen, Y., Dutartre, H., Sophys, M., Morera, S., Guerreiro, C., Schneider, B., Mulard, L., Janin, J., Veron, M., Deville-Bonne, D., and Canard, B. (2003). Structural analysis of the activation of ribavirin analogs by ndp kinase: Comparison with other ribavirin targets. *Mol Pharmacol* 63(3), 538-546.

BIBLIOGRAFÍA

Garcia, S., Crance, J. M., Billecocq, A., Peinnequin, A., Jouan, A., Bouloy, M., and Garin, D. (2001). Quantitative real-time pcr detection of rift valley fever virus and its application to evaluation of antiviral compounds. *J Clin Microbiol.* 39(12), 4456-4461.

García-Arriaza, J., Manrubia, S. C., Toja, M., Domingo, E., and Escarmís, C. (2004). Evolutionary transition toward defective rnas that are infectious by complementation. *J. Virol.* 78(21), 11678-85.

García-Arriaza, J., Domingo, E., and Escarmís, C. (2005). A segmented form of foot-and-mouth disease virus interferes with standard virus: A link between interference and competitive fitness. *Virology* 335(2), 155-64.

Ge, L., Zhang, J., Zhou, X., and Li, H. (2007). Genetic structure and population variability of tomato yellow leaf curl china virus. *J Virol* 81(11), 5902-7.

Ghosh, A., Nayak, R., and Shaila, M. S. (1996). Inhibition of replication of rinderpest virus by 5-fluorouracil. *Antiviral Res.* 31(1-2), 35-44.

Ghoshal, K., and Jacob, S. T. (1997). An alternative molecular mechanism of action of 5-fluorouracil, a potent anticancer drug. *Biochem. Pharmacol.* 53(11), 1569-75.

González-López, C., Arias, A., Pariente, N., Gómez-Mariano, G., and Domingo, E. (2004). Preextinction viral rna can interfere with infectivity. *J. Virol.* 78(7), 3319-24.

González-López, C., Gómez-Mariano, G., Escarmís, C., and Domingo, E. (2005). Invariant aphthovirus consensus nucleotide sequence in the transition to error catastrophe. *Infection Genetics and Evolution* 5, 366-374.

Gordon, M. P., and Staehelin, M. (1959). Studies on the incorporation of 5-fluorouracil into a virus nucleic acid. *Biochim. Biophys. Acta.* 36, 351-61.

Goswami, B. B., Borek, E., Sharma, O. K., Fujitaki, J., and Smith, R. A. (1979). The broad spectrum antiviral agent ribavirin inhibits *capping* of mrna. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 89(3), 830-6.

Graci, J. D., and Cameron, C. E. (2006). Mechanisms of action of ribavirin against distinct viruses. *Rev. Med. Virol.* 16(1), 37-48.

Graci, J. D., and Cameron, C. E. (2008). Therapeutically targeting rna viruses via lethal mutagenesis. *Future Virol* 3(6), 553-566.

Graham, A. F., and Kirk, C. (1965). Effect of 5-fluorouracil on the growth of bacteriophage r17. *J Bacteriol* 90(4), 928-35.

Grande-Pérez, A., Sierra, S., Castro, M. G., Domingo, E., and Lowenstein, P. R. (2002). Molecular indetermination in the transition to error catastrophe: Systematic elimination of lymphocytic choriomeningitis virus through mutagenesis does not correlate linearly with large increases in mutant spectrum complexity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99(20), 12938-43.

Grande-Pérez, A., Gómez-Mariano, G., Lowenstein, P. R., and Domingo, E. (2005a). Mutagenesis-induced, large fitness variations with an invariant arenavirus consensus genomic nucleotide sequence. *J. Virol.* 79(16), 10451-9.

Grande-Pérez, A., Lazaro, E., Lowenstein, P., Domingo, E., and Manrubia, S. C. (2005b). Suppression of viral infectivity through lethal defection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102(12), 4448-52.

Greenbaum, B. D., Li, O. T., Poon, L. L., Levine, A. J., and Rabadan, R. (2012). Viral reassortment as an information exchange between viral segments. *PNAS* 109(9), 3341-3346.

Hall, L., and Rueckert, R. R. (1971). Infection of mouse fibroblasts by cardioviruses: Premature uncoating and its prevention by elevated pH and magnesium chloride. *Virology* 43(1), 152-165.

Haspel, M. V., Lampert, P. W., and Oldstone, M. B. (1978). Temperature-sensitive mutants of mouse hepatitis virus produce a high incidence of demyelination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 4033-4036.

Hastie, K. M., Kimberlin, C. R., Zandonatti, M. A., MacRae, I. J., and Saphire, E. O. (2011a). Structure of the lassa virus nucleoprotein reveals a dsRNA-specific 3' to 5' exonuclease activity essential for immune suppression. *PNAS* 108(6), 2396-2401.

Hastie, K. M., Liu, T., Li, S., King, L. B., Ngo, N., Zandonatti, M. A., Woods, V. L., de la Torre, J. C., and Saphire, E. O. (2011b). Crystal structure of the lassa virus nucleoprotein-RNA complex reveals a gating mechanism for RNA binding. *PNAS* 108(48), 19365-19370.

Health, N. I. O. (2002). National Institutes of Health consensus development conference statement: Management of hepatitis C: 2002--June 10-12, 2002. *Hepatology* 36(5 Suppl 1), S3-20.

Heidelberger, C., Chaudhuri, N. K., Danneberg, P., Mooren, D., Griesbach, L., Duschinsky, R., Schnitzer, R. J., Plevin, E., and Sheiner, J. (1957). Fluorinated pyrimidines, a new class of tumour-inhibitory compounds. *Nature* 179(4561), 663-666.

BIBLIOGRAFÍA

Henry, M., Guetard, D., Suspene, R., Rusniok, C., Wain-Hobson, S., and Vartanian, J. P. (2009). Genetic editing of hbv DNA by monodomain human apobec3 cytidine deaminases and the recombinant nature of apobec3g. *PLoS One* 4(1), e4277.

Hofmann, W. P., Polta, A., Herrmann, E., Mihm, U., Kronenberger, B., Sonntag, T., Lohmann, V., Schonberger, B., Zeuzem, S., and Sarrazin, C. (2007). Mutagenic effect of ribavirin on hepatitis c nonstructural 5b quasispecies in vitro and during antiviral therapy. *Gastroenterology* 132(3), 921-30.

Hofmann, W. P., Herrmann, E., Sarrazin, C., and Zeuzem, S. (2008). Ribavirin mode of action in chronic hepatitis c: From clinical use back to molecular mechanisms. *Liver Int* 28(10), 1332-43.

Holland, J. J., Spindler, K., Horodyski, F., Grabau, E., Nichol, S., and VandePol, S. (1982). Rapid evolution of rna genomes. *Science* 215(4540), 1577-1585.

Holland, J. J., Domingo, E., de la Torre, J. C., and Steinhauer, D. A. (1990). Mutation frequencies at defined single codon sites in vesicular stomatitis virus and poliovirus can be increased only slightly by chemical mutagenesis. *J. Virol.* 64, 3960-3962.

Huggins, J. W. (1989). Prospects for treatment of viral hemorrhagic fevers with ribavirin, a broad-spectrum antiviral drug. *Rev Infect Dis Supl4*, S750-761.

Hultgren, C., Milich, D. R., Weiland, O., and Sallberg, M. (1998). The antiviral compound ribavirin modulates the t helper (th) 1/th2 subset balance in hepatitis b and c virus-specific immune responses. *J Gen Virol* 79 (Pt 10), 2381-91.

Iranzo, J., Perales, C., Domingo, E., and Manrubia, S. C. (2011). Tempo and mode of inhibitor-mutagen antiviral therapies: A multidisciplinary approach. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(38), 16008-16013.

Isnard, M., Granier, M., Frutos, R., Reynaud, B., and Peterschmitt, M. (1998). Quasispecies nature of three maize streak virus isolates obtained through different modes of selection from a population used to assess response to infection of maize cultivars. *J. Gen. Virol.* 79, 3091-9.

Jahriling, P. B., Hesse, R. A., Eddy, G. A., Johnson, K. M., Callis, R. T., and Stephen, E. L. (1980). Lassa virus infection of rhesus monkeys: Pathogenesis and treatment with ribavirin. *J Infect Dis* 141(5), 580-9.

Jahrling, P. B., Peters, C. J., and Stephen, E. L. (1984). Enhanced treatment of lassa fever by immune plasma combined with ribavirin in cynomolgus monkeys. *J Infect Dis* 149(3), 420-7.

Jordan, I., Briese, T., Fischer, N., Lau, J. Y., and Lipkin, W. I. (2000). Ribavirin inhibits west nile virus replication and cytopathic effect in neural cells. *J Infect Dis* 182(4), 1214-7.

Kanamaru, R., Kakuta, H., Sato, T., Ishioka, C., and Wakui, A. (1986). The inhibitory effects of 5-fluorouracil on the metabolism of preribosomal and ribosomal rna in l-1210 cells in vitro. *Cancer Chemother Pharmacol.* 17(1), 43-46.

Kanda, T., Yokosuka, O., Imazeki, F., Tanaka, M., Shino, Y., Shimada, H., Tomonaga, T., Nomura, F., Nagao, K., Ochiai, T., and Saisho, H. (2004). Inhibition of subgenomic hepatitis c virus rna in huh-7 cells: Ribavirin induces mutagenesis in hcv rna. *J. Viral. Hepat.* 11(6), 479-87.

Kash, J. C., Goodman, A. G., Korth, M. J., and Katze, M. G. (2006). Hijacking of the host-cell response and translational control during influenza virus infection. *Virus Research* 119, 111-120.

Kenyon, R. H., Canonico, P. G., Green, D. E., and Peters, C. J. (1986). Effect of ribavirin and tributylribavirin on argentine hemorrhagic fever (junin virus) in guinea pigs. *Antimicrob Agents Chemother* 29(3), 521-3.

Kerber, R., Rieger, T., Busch, C., Flatz, L., Pinschewer, D. D., Kümmerer, B. M., and Günther, S. (2011). Cross-species analysis of the replication complex of old world arenaviruses reveals two nucleoprotein sites involved in l protein function. *J Virol* 85(23), 12518-12528.

Kerr, S. J. (1987). Ribavirin induced differentiation of murine erythroleukemia cells. *Mol Cell Biochem* 77(2), 187-94.

Kirzinger, M. W., and Stavrinides, J. (2012). Host specificity determinants as a genetic continuum. *Trends Microbiology* 20(2), 88-93.

Kranzusch, P. J., and Whelan, S. P. (2011). Arenavirus z protein controls viral rna synthesis by locking a polymerase-promoter complex. *PNAS* 108(49), 19743-19748.

Kunkel, T. A., and Alexander, P. S. (1986). The base substitution fidelity of eucaryotic DNA polymerases. Mismatching frequencies, site preferences, insertion preferences, and base substitution by dislocation. *The journal of biological chemistry* 261(1), 160-166.

BIBLIOGRAFÍA

Kunz, B. A., and Kohalmi, S. E. (1991). Modulation of mutagenesis by deoxyribonucleotide levels. *Annu. Rev. Genet.* 25, 339-59.

Lamontagne, L. M., and Dupuy, J. M. (1984). Persistent infection with mouse hepatitis virus 3 in mouse lymphoid cell lines. *Infection and Immunity* 44(3), 716-723.

Lanford, R. E., Chavez, D., Guerra, B., Lau, J. Y., Hong, Z., Brasky, K. M., and Beames, B. (2001). Ribavirin induces error-prone replication of gb virus b in primary tamarin hepatocytes. *J. Virol.* 75(17), 8074-81.

Lasken, R. S., and Goodman, M. F. (1984). The biochemical basis of 5-bromouracil-induced mutagenesis. Heteroduplex base mispairs involving bromouracil in g x c----a x t and a x t----g x c mutational pathways. *J. Biol. Chem.* 259(18), 11491-5.

Lee, C. H., Gilbertson, D. L., Novella, I. S., Huerta, R., Domingo, E., and Holland, J. J. (1997). Negative effects of chemical mutagenesis on the adaptive behavior of vesicular stomatitis virus. *J. Virol.* 71(5), 3636-3640.

Lee, K. J., Novella, I. S., Teng, M. N., Oldstone, M. B., and de La Torre, J. C. (2000). Np and 1 proteins of lymphocytic choriomeningitis virus (lcmv) are sufficient for efficient transcription and replication of lcmv genomic rna analogs. *J Virol* 74(8), 3470-7.

Lenz, H. J., Manno, D. J., Danenberg, K. D., and Danenberg, P. V. (1994). Incorporation of 5-fluorouracil into u2 and u6 snrna inhibits mrna precursor splicing. *J Biol Chem.* 269(59), 31962-31968.

Levingston Macleod, J. M., D'Antuono, A., Loureiro, M. E., Casabona, J. C., Gomez, G. A., and Lopez, N. (2011). Identification of two functional domains within the arenavirus nucleoprotein. *J Virol* 85(5), 2012-23.

Levy, H., Bostina, M., Filman, D. J., and Hogle, J. M. (2010). "Cell entry: A biochemical and structural perspective. In: The picornaviruses. E. Ehrenfeld, e. Domingo and r.P. Roos, eds." ASM Press, Washington DC. pp. 87-106.

Loeb, L. A., Essigmann, J. M., Kazazi, F., Zhang, J., Rose, K. D., and Mullins, J. I. (1999). Lethal mutagenesis of hiv with mutagenic nucleoside analogs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 1492-1497.

Longley, D. B., Harkin, D. P., and Johnston, P. G. (2003). 5-fluorouracil: Mechanisms of action and clinical strategies. *Nat. Rev. Cancer.* 3(5), 330-338.

López-Bueno, A., Villarreal, L. P., and Almendral, J. M. (2006). Parvovirus variation for disease: A difference with rna viruses? In "Current topics in microbiol. And immunol.", Vol. 299, pp. 349-370.

Loureiro, M. E., Wilda, M., Levingston Macleod, J. M., D'Antuono, A., Foscaldi, S., Marino Buslje, C., and Lopez, N. (2011). Molecular determinants of arenavirus z protein homo-oligomerization and l polymerase binding. *J Virol* 85(23), 12304-12314.

Lucia, H. L., Coppenhaver, D. H., and Baron, S. (1989). Arenavirus infection in the guinea pig model: Antiviral therapy with recombinant interferon-alpha, the immunomodulator cl246,738 and ribavirin. *Antiviral Res* 12(5-6), 279-92.

Manrubia, S. C., Escarmis, C., Domingo, E., and Lazaro, E. (2005). High mutation rates, bottlenecks, and robustness of rna viral quasispecies. *Gene* 347(2), 273-82.

Mardani, M., Jahromi, M. K., Naieni, K. H., and Zeinali, M. (2003). The efficacy of oral ribavirin in the treatment of crimean-congo hemorrhagic fever in iran. *Clin Infect Dis.* 36(12), 1613-1618.

Marroquí, L., Estepa, A., and Perez, L. (2007). Assessment of the inhibitory effect of ribavirin on the rainbow trout rhabdovirus vhsv by real-time reverse-transcription pcr. *Vet Microbiol.* 122(1-2), 52-60.

Martin, V., Grande-Perez, A., and Domingo, E. (2008). No evidence of selection for mutational robustness during lethal mutagenesis of lymphocytic choriomeningitis virus. *Virology* 378(1), 185-92.

Martin, V., Abia, D., Domingo, E., and Grande-Perez, A. (2010). An interfering activity against lymphocytic choriomeningitis virus replication associated with enhanced mutagenesis. *J Gen Virol* 91(Pt 4), 990-1003.

Martínez-Sobrido, L., Giannakas, P., Cubitt, B., García-Sastre, A., and de la Torre, J. C. (2007). Differential inhibition of type i interferon induction by arenavirus nucleoproteins. *J Virol* 81(22), 12696-12703.

Martínez-Sobrido, L., Emonet, S., Giannakas, P., Cubitt, B., García-Sastre, A., and de la Torre, J. C. (2009). Identification of amino acid residues critical for the anti-interferon activity of the nucleoprotein of the prototypic arenavirus lymphocytic choriomeningitis virus. *J Virol* 83(21), 11330-11340.

Matloubian, M., Kolhekar, S. R., Somasundaram, T., and Ahmed, R. (1993). Molecular determinants of macrophage tropism and viral persistence: Importance of single amino acid changes in the polymerase and glycoprotein of lymphocytic choriomeningitis virus. *J Virol* 67(12), 7340-9.

McCormick, J. B., Getchell, J. P., Mitchell, S. W., and Hicks, D. R. (1984). Ribavirin suppresses replication of lymphadenopathy-associated virus in cultures of human adult t lymphocytes. *Lancet* 2(8416), 1367-1369.

BIBLIOGRAFÍA

McCormick, J. B., King, I. J., Webb, P. A., Scribner, C. L., Craven, R. B., Johnson, K. M., Elliott, L. H., and Belmont-Williams, R. (1986). Lassa fever. Effective therapy with ribavirin. *N. Engl. J. Med.* 314(1), 20-6.

Mehle, A., Dugan, V. G., Taubenberger, J. K., and Doudna, J. A. (2012). Reassortment and mutation of the avian influenza virus polymerase pa subunit overcome species barriers. *J virol* 86(3), 1750-1757.

Medina, J., García-Buey, L., Moreno-Monteagudo, J. A., Trapero-Marugán, M., and Moreno-Otero, R. (2003). Combined antiviral options for the treatment of chronic hepatitis c. *Antiviral Research* 60, 135-143.

Medina, M., Domingo, E., Brangwyn, J. K., and Belsham, G. J. (1993). The two species of the foot-and-mouth disease virus leader protein, expressed individually, exhibit the same activities. *Virology* 194(1), 355-359.

Mikkelsen, J. G., and Pedersen, F. S. (2000). Genetic reassortment and patch repair by recombination in retroviruses. *Journal of biomedical science* 7(2), 77-99.

Moreno, H., Gallego, I., Sevilla, N., de la Torre, J. C., Domingo, E., and Martin, V. (2011). Ribavirin can be mutagenic for arenaviruses. *J Virol* 85(14), 7246-55.

Moreno, H., Tejero, H., De la Torre, J. C., Domingo, E., and Martin, V. (2012). Mutagenesis-mediated virus extinction: Virus-dependent effect of viral load on sensitivity to lethal defection. *PLoS One* 7(3).

Morgenstern, B., Michaelis, M., Baer, P. C., Doerr, H. W., and Cinatl, J. J. (2005). Ribavirin and interferon-beta synergistically inhibit sars-associated coronavirus replication in animal and human cell lines. *Biochem Biophys Res Commun.* 326(4), 905-908.

Morin, B., Coutard, B., Lelke, M., Ferron, F., Kerber, R., Jamal, S., Frangeul, A., Baronti, C., Charrel, R., de Lamballerie, X., Vonnheim, C., Lescar, J., Brice, G., Günther, S., and Canard, B. (2010). The n-terminal domain of the arenavirus l protein is an rna endonuclease essential in mrna transcription. *PLoS Pathog.* 6(9).

Moriyama, K., Suzuki, T., Negishi, K., Graci, J. D., Thompson, C. N., Cameron, C. E., and Watanabe, M. (2008). Effects of introduction of hydrophobic group on ribavirin base on mutation induction and anti-rna viral activity. *J Med Chem* 51(1), 159-66.

Mudd, J. A., Leavitt, R. W., Kingsbury, D. T., and Holland, J. J. (1973). Natural selection of mutants of vesicular stomatitis virus by cultured cells of drosophila melanogaster. *J Gen Virol* 20(3), 341-51.

Müller, W. E., Maidhof, A., Taschner, H., and Zahn, R. K. (1977). Virazole (1-beta-d-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide; a cytostatic agent. *Biochem Pharmacol.* 26(11), 1071-1075.

Munyon, W., and Salzman, N. P. (1962). The incorporation of 5-fluoro-uracil into poliovirus. *Virology* 18, 95-101.

Ning, Q., Brown, D., Parodo, J., Catral, M., Gorczynski, R., Cole, E., Fung, L., Ding, J. W., Liu, M. F., Rotstein, O., Phillips, M. J., and Levy, G. (1998). Ribavirin inhibits viral-induced macrophage production of tnfr, il-1, the pro-coagulant fgl2 prothrombinase and preserves th1 cytokine production but inhibits th2 cytokine response. *J Immunol* 160(7), 3487-93.

Niwa, K., Tagami, K., Lian, Z., Gao, J., Mori, H., and Tamaya, T. (2003). Topical vidarabine or 5-fluorouracil treatment against persistent hpv in genital (pre)cancerous lesions. *Oncol Rep* 10(5), 1437-41.

Nowak, M. A. (1992). What is a quasispecies? *Trends In Ecol. and Evol.* 4, 118-121.

Ojosnegros, S., Beerenwinkel, N., Antal, T., Nowak, M. A., Escarmis, C., and Domingo, E. (2010). Competition-colonization dynamics in an rna virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(5), 2108-12.

Ölschläger, S., Neyts, J., and Günther, S. (2011). Depletion of gtp pool is not the predominant mechanism by which ribavirin exerts its antiviral effect on lassa virus. *Antiviral Research* 91, 89-93.

Ortiz-Riaño, E., Cheng, B. Y., de la Torre, J. C., and Martínez-Sobrido, L. (2011). The c-terminal region of lymphocytic choriomeningitis virus nucleoprotein contains distinct and segregable functional domains involved in np-z interaction and counteraction of the type i interferon response. *J Virol* 85(24), 13038-13048.

Oxford, J. S. (1975). Inhibition of the replication of influenza a and b viruses by a nucleoside analogue (ribavirin). *J Gen Virol.* 28(3), 409-414.

Paeshuyse, J., Dallmeier, K., and Neyts, J. (2011). Ribavirin for the treatment of chronic hepatitis c virus infection: A review of the proposed mechanisms of action. *Curr Opin Virol.* 1(6), 590-598.

Pariente, N., Sierra, S., Lowenstein, P. R., and Domingo, E. (2001). Efficient virus extinction by combinations of a mutagen and antiviral inhibitors. *J. Virol.* 75(20), 9723-30.

BIBLIOGRAFÍA

Pariente, N., Airaksinen, A., and Domingo, E. (2003). Mutagenesis versus inhibition in the efficiency of extinction of foot-and-mouth disease virus. *J. Virol.* 77(12), 7131-8.

Parker, W. B., and Cheng, Y. C. (1990). Metabolism and mechanism of action of 5-fluorouracil. *Pharmacol. Ther* 48(3), 381-395.

Patton, J. R. (1993). Ribonucleoprotein particle assembly and modification of u2 small nuclear rna containing 5-fluorouridine. *Biochemistry* 32(34), 8939-8944.

Pawlotsky, J. M. (1998a). Genetic heterogeneity and properties of hepatitis c virus. *Acta Gastroenterol Belg* 61(2), 189-91.

Pawlotsky, J. M., Pellerin, M., Bouvier, M., Roudot-Thoraval, F., Germanidis, G., Bastie, A., Darthuy, F., Remire, J., Soussy, C. J., and Dhumeaux, D. (1998b). Genetic complexity of the hypervariable region 1 (hvr1) of hepatitis c virus (hcv): Influence on the characteristics of the infection and responses to interferon alfa therapy in patients with chronic hepatitis c. *J Med Virol* 54(4), 256-64.

Perales, C., Mateo, R., Mateu, M. G., and Domingo, E. (2007). Insights into rna virus mutant spectrum and lethal mutagenesis events: Replicative interference and complementation by multiple point mutants. *J. Mol. Biol.* 369(4), 985-1000.

Perales, C., Agudo, R., Tejero, H., Manrubia, S. C., and Domingo, E. (2009). Potential benefits of sequential inhibitor-mutagen treatments of rna virus infections. *PLoS Pathog* 5(11), e1000658.

Perales, C., Martín, V., and Domingo, E. (2011). Lethal mutagenesis of viruses. *Current Opinion in Virology*, in press.

Pfeiffer, J. K., and Kirkegaard, K. (2005). Increased fidelity reduces poliovirus fitness under selective pressure in mice. *PLoS Pathogens* 1, 102-110.

Pianko, S., and G., H. J. (2000). Treatment of hepatitis c with interferon and ribavirin. *Journal of Gastroenterolgy and Hepatology* 15, 581-586.

Pinschewer, D. D., Perez, M., and de la Torre, J. C. (2005). Dual role of the lymphocytic choriomeningitis virus intergenic region in transcription termination and virus propagation. *J. Virol.* 79(7), 4519-26.

Popescu, M., Schaefer, H., and Lehmann-Grube, F. (1976). Homologous interference of lymphocytic choriomeningitis virus: Detection and measurement of interference focus-forming units. *J Virol* 20(1), 1-8.

Pringle, C. R. (1970). Genetic characteristics of conditional lethal mutants of vesicular stomatitis virus induced by 5-fluorouracil, 5-azacytidine, and ethyl methane sulfonate. *J. Virol.* 5(5), 559-567.

Radloff, R. J., and Young, S. A. (1983). Defective interfering particles of encephalomyocarditis virus. *J. Gen. Virol.* 64, 1637-41.

Randerath, K., Tseng, W. C., Harris, J. S., and Lu, L. J. (1983). Specific effects of 5-fluoropyrimidines and 5-azapyrimidines on modification of the 5 position of pyrimidines, in particular the synthesis of 5-methyluracil and 5-methylcytosine in nucleic acids. *Recent Results Cancer Res.* 84, 283-297.

Rockstroh, J. K., Bhagani, S., Benhamou, Y., Bruno, R., Mauss, S., Peters, L., Puoti, M., Soriano, V., Tural, C., and Committee, E. E. (2008). European aids clinical society (eacs) guidelines for the clinical management and treatment of chronic hepatitis b and c coinfection in hiv-infected adults. *HIV Medicine* 9, 82-88.

Ruiz-Jarabo, C. M., Arias, A., Baranowski, E., Escarmís, C., and Domingo, E. (2000). Memory in viral quasispecies. *J. Virol.* 74, 3543-3547.

Ruiz-Jarabo, C. M., Ly, C., Domingo, E., and de la Torre, J. C. (2003). Lethal mutagenesis of the prototypic arenavirus lymphocytic choriomeningitis virus (lcmv). *Virology* 308(1), 37-47.

Rutman, R. J., Cantarow, A., and Paschkis, K. E. (1954). The catabolism of uracil in vivo and in vitro. *J Biol Chem.* 210(1), 321-329.

Saha, K., Zhang, J., Gupta, A., Dave, R., Yimen, M., and Zerhouni, B. (2001). Isolation of primary hiv-1 that target cd8+ t lymphocytes using cd8 as a receptor. *Nat. Med.* 7(1), 65-72.

Samuelsson, T. (1991). Interactions of transfer rna pseudouridine synthases with rnas substituted with fluorouracil. *Nucleic Acids Res.* 19(22), 6139-6144.

Sánchez, A. B., and de la Torre, J. C. (2005). Genetic and biochemical evidence for an oligomeric structure of the functional l polymerase of the prototypic arenavirus lymphocytic choriomeningitis virus. *J Virol* 79(11), 7262-7268.

Santi, D. V., and Hardy, L. W. (1987). Catalytic mechanism and inhibition of trna (uracil-5-)methyltransferase: Evidence for covalent catalysis. *Biochemistry* 26(26), 8599-8606.

BIBLIOGRAFÍA

Saunders, A. A., Ting, J. P., Meisner, J., Neuman, B. W., Perez, M., de la Torre, J. C., and Buchmeier, M. J. (2007). Mapping the landscape of the lymphocytic choriomeningitis virus stable signal peptide reveals novel functional domains. *J Virol* 81(11), 5649-5657.

Schaaper, R. M. (1993). Base selection, proofreading, and mismatch repair during DNA replication in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*. 15, 268-300.

Scheidel, L. M., Durbin, R. K., and Stollar, V. (1987). Sindbis virus mutants resistant to mycophenolic acid and ribavirin. *Virology* 158(1), 1-7.

Seet, B. T., Johnston, J. B., Brunetti, C. R., Barrett, J. W., Everett, H., Cameron, C., Sypula, J., Nazarian, S. H., Lucas, A., and McFadden, G. (2003). Poxviruses and immune evasion. *Annu. Rev. Immunol.* 21, 377-423.

Severson, W. E., Schmaljohn, C. S., Javadian, A., and Jonsson, C. B. (2003). Ribavirin causes error catastrophe during hantaan virus replication. *J. Virol.* 77(1), 481-8.

Shigeta, S., Mori, S., Watanabe, J., Soeda, S., Takahashi, K., and Yamase, T. (1997). Synergistic anti-influenza virus A (H1N1) activities of pm-523 (polyoxometalate) and ribavirin in vitro and in vivo. *Antimicrob Agents Chemother.* 41(7), 1423-7.

Sidwell, O. W., Simon, L. N., Witkowski, J. T., and Robins, R. K. (1974). Antiviral activity of virazole: Review and structure-activity relationships. *Prog Chemotherapy* 2, 889-903.

Sierra, S., Dávila, M., Lowenstein, P. R., and Domingo, E. (2000). Response of foot-and-mouth disease virus to increased mutagenesis. Influence of viral load and fitness in loss of infectivity. *J. Virol.* 74, 8316-8323.

Sierra, M., Airaksinen, A., González-López, C., Agudo, R., Arias, A., and Domingo, E. (2007). Foot-and-mouth disease virus mutant with decreased sensitivity to ribavirin: Implications for error catastrophe. *J. Virol.* 81, 2012-2024.

Smee, D. F., Gilbert, J., Leonhardt, J. A., Barnett, B. B., Huggins, J. H., and Sidwell, R. W. (1993). Treatment of lethal picornavirus infections in weanling Ivg/lak hamsters with ribavirin, ribamidine, selenazofurin, and amplitagen. *Antiviral Res* 20(1), 57-70.

Snell, N. J. (2001). Ribavirin-current status of a broad spectrum antiviral agent. *Expert Opin. Pharmacother.* 2(8), 1317-24.

Sobrinho, F., Dávila, M., Ortín, J., and Domingo, E. (1983). Multiple genetic variants arise in the course of replication of foot-and-mouth disease virus in cell culture. *Virology* 128, 310-318.

Solé, R. V., and Deisboeck, T. S. (2004). An error catastrophe in cancer? *J Theor Biol* 228(1), 47-54.

Song, Y., Paul, A. V., and Wimmer, E. (2012). Evolution of poliovirus defective interfering particles expressing gaussia luciferase. *J. Virol.* 86(4), 1999-2010.

Spear, P. G., Eisenberg, R. J., and Cohen, G. H. (2000). Three classes of cell surface receptors for alphaherpesvirus entry. *Virology* 275(1), 1-8.

Staehelin, M., and Gordon, M. P. (1960). Effects of halogenated pyrimidines on the growth of tobacco mosaic virus. *Biochim Biophys Acta* 38, 307-15.

Stevenson, N. J., Murphy, A. G., Bourke, N. M., Keogh, C. A., Hegarty, J. E., and O'Farrelly, C. (2011). Ribavirin enhances ifn- α signalling and mx α expression: A novel immune modulation mechanism during treatment of hcv. *Plos ONE* 6(11), e27866.

Strecker, T., Eichler, R., Meulen, J., Weissenhorn, W., Dieter Klenk, H., Garten, W., and Lenz, O. (2003). Lassa virus z protein is a matrix protein and sufficient for the release of virus-like particles *J Virol* 77(19), 10700-10705.

Streeter, D. G., Witkowski, J. T., Khare, G. P., Sidwell, R. W., Bauer, R. J., Robins, R. K., and Simon, L. N. (1973). Mechanism of action of 1- β -D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide (virazole), a new broad-spectrum anti-viral agent. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70(4), 1174-8.

Stuyver, L. J., Lostia, S., Patterson, S. E., Clark, J. L., Watanabe, K. A., Otto, M. J., and Pankiewicz, K. W. (2002). Inhibitors of the impdh enzyme as potential anti-bovine viral diarrhoea virus agents. *Antivir Chem Chemother.* 13(6), 345-352.

Suzuki, S., Saneyoshi, M., Nakayama, C., Nishiyama, Y., and Yoshida, S. (1985). Mechanism of selective inhibition of human cytomegalovirus replication by 1- β -D-arabinofuranosyl-5-fluorouracil. *Antimicrob Agents Chemother* 28(2), 326-30.

Swetina, J., and Schuster, P. (1982). Self-replication with errors. A model for polynucleotide replication. *Biophys. Chem.* 16(4), 329-345.

Takhampunya, R., Ubol, S., Houng, H. S., Cameron, C. E., and Padmanabhan, R. (2006). Inhibition of dengue virus replication by mycophenolic acid and ribavirin. *J Gen Virol.* 87(7), 1947-1952.

BIBLIOGRAFÍA

Tam, P. E., and Messner, R. P. (1999). Molecular mechanisms of coxsackievirus persistence in chronic inflammatory myopathy: Viral rna persists through formation of a double-stranded complex without associated genomic mutations or evolution. *J. Virol.* 73(12), 10113-21.

Toltzis, P., O'Connell, K., and Patterson, J. L. (1988). Effect of phosphorylated ribavirin on vesicular stomatitis virus transcription. *Antimicrob Agents Chemother* 32(4), 492-7.

Van Tiel, F. H., Harmsen, M., Kraaijeveld, C. A., and Snippe, H. (1986). Inhibition of semliki forest virus multiplication by ribavirin: A potential method for the monitoring of antiviral agents in serum. *J Virol Methods.* 14(2), 119-125.

Vignuzzi, M., Stone, J. K., Arnold, J. J., Cameron, C. E., and Andino, R. (2006). Quasispecies diversity determines pathogenesis through cooperative interactions in a viral population. *Nature* 439, 344-348.

Vo, N. V., Young, K. C., and Lai, M. M. C. (2003). Mutagenic and inhibitory effects of ribavirin on hepatitis c virus rna polymerase. *Biochemistry* 42(35), 10462-71.

Volkenstein, M. V. (1994). "Physical approaches to biological evolution." Springer-Verlag, Berlin.

Watts, D. M., Ussery, M. A., Nash, D., and Peters, C. J. (1989). Inhibition of crimean-congo hemorrhagic fever viral infectivity yields in vitro by ribavirin. *Am J Trop Med Hyg.* 41(5), 581-585.

Webster, R. G. (1999). Antigenic variation in influenza viruses. In "Origin and evolution of viruses" (E. Domingo, R. G. Webster, and J. J. Holland, Eds.), pp. 377-390. Academic Press, San Diego.

Weissmann, C., Li, J., Mahal, S. P., and Browning, S. (2011). Prions on the move. *EMBO Rep* 12(11), 1109-17.

Welsh, R. M., and Pfau, C. J. (1972). Determinants of lymphocytic choriomeningitis interference. *J Gen Virol* 14(2), 177-87.

Willis, R. C., Carson, D. A., and Seegmiller, J. E. (1978). Adenosine kinase initiates the major route of ribavirin activation in a cultured human cell line. *PNAS* 75(7), 3042-3044.

Wittmann, H. G., and Wittmann-Liebold, B. (1966). Protein chemical studies of two rna viruses and their mutants. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 31, 163-72.

Wray, S. K., Gilbert, B. E., and Knight, V. (1985a). Effect of ribavirin triphosphate on primer generation and elongation during influenza virus transcription in vitro. *Antiviral Res* 5(1), 39-48.

Wray, S. K., Gilbert, B. E., Noall, M. W., and Knight, V. (1985b). Mode of action of ribavirin: Effect of nucleotide pool alterations on influenza virus ribonucleoprotein synthesis. *Antiviral Res* 5(1), 29-37.

Wyde, P. R., Chetty, S. N., Jewell, A. M., Boivin, G., and Piedra, P. A. (2003). Comparison of the inhibition of human metapneumovirus and respiratory syncytial virus by ribavirin and immune serum globulin in vitro. *Antiviral Res.* 60(1), 51-59.

Yu, H., Eritja, R., Bloom, L. B., and Goodman, M. F. (1993). Ionization of bromouracil and fluorouracil stimulates base mispairing frequencies with guanine. *J. Biol. Chem.* 268(21), 15935-15943.

Zhou, S., Liu, R., Baroudy, B. M., Malcolm, B. A., and Reyes, G. R. (2003). The effect of ribavirin and impdh inhibitors on hepatitis c virus subgenomic replicon rna. *Virology* 310(2), 333-42.

Zimmerman, T. P., and Deeprase, R. D. (1978). Metabolism of 5-amino-1-beta-d-ribofuranosylimidazole-4-carboxamide and related five-membered heterocycles to 5'-triphosphates in human blood and 15178y cells. *Biochem Pharmacol* 27(5), 709-16.

No-Authors (1996). Hiv adult standard of care. *Crit Path AIDS Proj.* 31, 10-16.

Ribavirin Can Be Mutagenic for Arenaviruses[▽]

Héctor Moreno,^{1,2} Isabel Gallego,¹ Noemí Sevilla,³ Juan Carlos de la Torre,²
 Esteban Domingo,^{1,4*} and Verónica Martín^{1,3}

Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Campus de Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain¹; Department of Neuropharmacology, The Scripps Research Institute, IMM-6, 10550 North Torrey Pines Road, La Jolla, California 92037²; Centro de Investigación en Sanidad Animal, Instituto Nacional de Investigación Agraria y Alimentaria, Valdeolmos, Madrid, Spain³; and Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas, Barcelona, Spain⁴

Received 28 March 2011/Accepted 29 April 2011

Arenaviruses include several important human pathogens, and there are very limited options of preventive or therapeutic interventions to combat these viruses. An off-label use of the purine nucleoside analogue ribavirin (1-β-D-ribofuranosyl-1-*H*-1,2,4-triazole-3-carboxamide) is the only antiviral treatment currently available for arenavirus infections. However, the ribavirin antiviral mechanism action against arenaviruses remains unknown. Here we document that ribavirin is mutagenic for the prototypic arenavirus lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) in cell culture. The mutagenic activity of ribavirin on LCMV was observed under single- and multiple-passage regimes and could not be accounted for by a decrease of the intracellular GTP pool promoted by ribavirin-mediated inhibition of inosine monophosphate dehydrogenase (IMPDH). Our findings suggest that the antiviral activity of ribavirin on arenaviruses might be exerted, at least partially, by lethal mutagenesis. Implications for antiarenavirus therapy are discussed.

Arenaviruses are a group of enveloped viruses with a bisegmented negative-strand RNA genome. Both the small (S) and large (L) genome RNAs use an ambisense coding strategy to direct the synthesis of two proteins; the S segment encodes the virus nucleoprotein (NP) and glycoprotein (GPC), whereas the L segment encodes the virus polymerase (L) and matrix (Z) proteins. Arenaviruses cause persistent infection in rodents with a worldwide distribution (11, 13, 72, 72a). Several arenaviruses can infect humans, which may result in severe clinical symptoms, including hemorrhagic fever (HF) disease in areas of South America (Junin virus in Argentina, Machupo virus in Bolivia, and Sabia virus in Brazil) and West Africa (Lassa and Lujo viruses). HF arenaviruses are a great public health concern in the regions where these viruses are endemic. In addition, arenaviruses also pose a biodefense threat, and six arenaviruses are category A agents (12, 13, 27, 72, 72a). On the other hand, the prototypic arenavirus lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) provides investigators with a superb model system for the investigation of virus-host interactions and associated disease (reviewed in references 72 and 72a). Moreover, mounting evidence indicates that LCMV is a neglected human pathogen of clinical significance (9, 31, 45, 73).

Public health concerns about arenavirus infections of humans are further exacerbated because of the lack of licensed vaccines and current therapy being limited to an off-label use of the purine nucleoside analogue ribavirin (1-β-D-ribofuranosyl-1-*H*-1,2,4-triazole-3-carboxamide) (1, 13, 36, 55, 66, 68). Ribavirin has been licensed for human use as an antiviral agent

for 4 decades (86, 89). It is administered either alone or in combination with other antiviral agents, and it is currently employed to treat chronic hepatitis C in combination with pegylated alpha interferon (IFN-α) and respiratory syncytial virus infections in infants and is used off-label to treat some other respiratory infections (21–23, 44, 66, 67). The antiviral activity of ribavirin is mediated by several mechanisms, including inhibition of the cellular inosine monophosphate dehydrogenase (IMPDH) and viral mutagenesis (reviewed in reference 37). The mutagenic activity of ribavirin was discovered with poliovirus (18) and then documented with several additional RNA viruses (37). Ribavirin triphosphate (RTP) is a substrate for the RNA-dependent RNA polymerases (RdRps) of some RNA viruses, and the incorporation of RTP in place of ATP or GTP results in mutagenic activity during viral RNA elongation (3, 5, 7, 17, 18, 62, 87).

LCMV exhibits the high mutation rates and quasispecies dynamics typical of RNA viruses, and this confers this pathogen great adaptability to different environments (26, 28, 85). Because of the need to explore new strategies for the control of arenavirus-associated disease, we took LCMV as a model system to investigate lethal mutagenesis or virus extinction through an increase in the mutation rate (for reviews, see references 6, 24, 32, and 38). The analogue 5-fluorouracil (FU) is an effective mutagenic agent for LCMV and can lead to viral extinction through a decrease in the specific infectivity of the mutagenized virus (39–41). Ribavirin has also been used to extinguish RNA viruses by lethal mutagenesis (38). However, in studies in which ribavirin was administered to arenavirus-infected cells or animals, the drug acted as an inhibitor of viral replication, but no mutagenic activity was reported (29, 43, 49, 51, 60, 81, 83, 88). In our previous studies on lethal mutagenesis, we documented a higher efficacy of a mutagen-inhibitor combination treatment over administration of a mutagen alone (74, 92). In an exploration of protocols to achieve extinction of

* Corresponding author. Mailing address: Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CSIC-UAM), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Campus de Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain. Phone: 34-911964540. Fax: 34-911964420. E-mail: edomingo@cblm.uam.es.

[▽] Published ahead of print on 11 May 2011.

foot-and-mouth disease virus (FMDV) using ribavirin as a mutagenic agent and guanidine hydrochloride as an inhibitor of FMDV replication, we observed an advantage of a sequential inhibitor-mutagen treatment over the corresponding combination treatment (77). The scope of the advantage of the sequential treatment is currently under investigation. Since the advantage of the sequential treatment was dependent on one of the drugs being a mutagenic agent, we reexamined the inhibitory and potential mutagenic activity of ribavirin on LCMV. Here we provide evidence that besides its well-documented inhibitory activity on arenavirus multiplication, ribavirin also exerts mutagenic activity when present at subinhibitory concentrations (that is, concentrations that result in lower but detectable progeny production) during virus replication in cultured cells. The inhibitory and mutagenic activities of ribavirin were largely reversed by supplying cells with excess guanosine, suggesting that both activities may operate in competition with intracellular GTP. However, the mutagenic activity of ribavirin on LCMV cannot be attributed to a depletion of intracellular GTP levels as a result of inhibition of IMPDH, because treatment with mycophenolic acid (MPA), an inhibitor of IMPDH (33), did not exert any detectable mutagenic activity on LCMV. Our findings raise the possibility that lethal mutagenesis promoted by ribavirin-induced mutagenesis might contribute to the antiviral activity of ribavirin against LCMV and arenaviruses in general.

MATERIALS AND METHODS

Cells, virus, and drugs. Lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) strain Armstrong (Arm) 53b is a clone from LCMV Arm CA that was plaque purified three times and passaged four times in BHK-21 cells. This virus was used for all cell culture infections described in the present study. Procedures to grow BHK-21 and Vero cells and to infect cells with LCMV have been previously described (39–41, 64). Briefly, for single-step infections, BHK-21 cells were infected with LCMV at a multiplicity of infection (MOI) of 10 PFU/cell in the presence or absence of ribavirin, mycophenolic acid (MPA), or guanosine or combinations of these drugs at the concentrations indicated for each experiment. Progeny virus was collected at 48 h postinfection (p.i.) from the cell culture medium. For serial passages, infections of BHK-21 cells were carried out at an MOI of 0.01 PFU/cell in the presence or absence of drugs as indicated for each experiment. In each passage, the cells were infected with the progeny virus from the preceding infection and collected at 48 h postinfection. For LCMV infections in the presence of ribavirin, BHK-21 cells were preincubated with the desired amount of ribavirin (Sigma) (0, 10, 20, or 100 μ M) for 7 h, and the same ribavirin concentration was maintained throughout the infection. The toxicity of ribavirin for BHK-21 cells under the culture conditions used in the present study has been previously reported (3, 77). BHK-21 cells maintained at least 90% viability after 48 h of treatment with 100 μ M ribavirin compared to control BHK-21 cells maintained in parallel in the absence of the drug. For LCMV infections in the presence of 0, 5, and 30 μ M MPA, no toxicity for the cells was detected (100% survival after 48 h in 30 μ M MPA). Treatment of BHK-21 cells with guanosine (100 μ M), which did not result in detectable toxicity for the cells, was carried out as previously described (5). LCMV was titrated by plaque assay on Vero cell monolayers (4). Mock-infected BHK-21 and Vero cells were maintained in parallel, and the corresponding cell culture supernatants were titrated to control possible viral contamination. No infectivity was detected in the mock-infected cultures at any time.

RNA extraction, RT-PCR amplification, and LCMV RNA quantification. RNA was extracted from the supernatants of LCMV-infected cultures using Trizol (Invitrogen), following the manufacturer's instructions. LCMV RNA was amplified by reverse transcriptase PCR (RT-PCR) using RT transcriptase (Roche) and *Pfu* DNA polymerase (Promega) and the following pair of primers, primers L3654F (F stands for forward) (5'-AGTTTAAGAACCCTTCCCGC-3'; residues 3654 to 4268) and L4260R (R stands for reverse) (5'-CGAGACACCTTGGGAGTTGTGC-3'; residues 4239 to 4260). Nucleotide positions are given in the viral (genomic) sense and refer to the consensus genomic sequence

determined previously for the L segment (GenBank accession number AY847351-L) (39). To ensure that in the RT-PCR amplification, excess LCMV RNA template was present for quasispecies analysis, 1:10 and 1:100 dilutions of the initial template preparations were amplified in parallel. Only preparations that yielded a positive amplification band at the two dilutions were subjected to molecular cloning and sequencing of individual clones (5). The amplified cDNAs were either purified with a Wizard PCR purification kit (Promega) or subjected to agarose (Pronadisa) gel electrophoresis; the cDNA band was extracted from the gel using a QIAEX II gel extraction kit (Qiagen). Purified DNA was sequenced by Macrogen, Inc., to obtain the consensus sequence of the corresponding population.

Genomic large (L) RNA was quantified by Light Cycler DNA Master SYBR green I kit (Roche), according to the manufacturer's instructions. The polymerase-coding region was amplified with primers L4183F (5'-ATCGAGGCCA CACTGATCTT-3'; residues 4183 to 4202) and L4260R (5'-CGAGACACCTT GGAGTTGTGC-3'; residues 4239 to 4260). An LCMV RNA fragment spanning nucleotides 3662 to 4268 was used as the standard. This was obtained as a runoff transcript from a molecular DNA clone of the polymerase-coding region in the genomic sense, cloned into pGEM-T Easy vector (Promega). The denaturation curve of the amplified DNAs was determined to monitor the specificity of the reaction. Negative controls (without template RNA) were run in parallel with each amplification reaction mixture. Each value is the average of at least three determinations. The specific infectivity of LCMV was calculated by dividing the number of progeny infectivity (PFU) by the amount of LCMV RNA in the same volume of culture medium.

Molecular cloning and calculation of mutant spectrum complexity. Molecular clones were prepared from cDNA (the band corresponding to the RT-PCR amplification obtained with undiluted template) using primers L3654F and L4260R (described above in "RNA extraction, RT-PCR amplification, and LCMV RNA quantification"). cDNA was ligated to the pGEM-T Easy vector (Promega) and transformed into *Escherichia coli* DH5 α . cDNA from individual positive *E. coli* colonies was amplified with Templiphi (GE Healthcare) and sequenced (Macrogen, Inc.).

The average mutation frequency among components of the mutant spectrum of an LCMV population was calculated by dividing the number of different mutations found by the total number of nucleotides sequenced. The Shannon entropy (S) (which measures the proportion of different sequences in the region analyzed) was calculated using the formula $S = -[\sum (p_i \times \ln p_i)] / \ln N$ where p_i is the proportion of each sequence in the mutant spectrum and N is the total number of sequences compared (94). An S value of 0 means that all sequences are identical, while a value of 1 means that the sequences are different from each other. Statistical significance values were calculated using Prism software program version 5.0 or higher. The mutation frequency calculated for LCMV passaged in the absence of ribavirin was at least 2.8-fold larger than can be attributed to the error incorporation during the RT-PCR procedure used (82).

RESULTS

Assessment of the inhibitory and mutagenic activity of ribavirin during LCMV replication in cultured cells. We first compared the inhibitory effect of ribavirin on LCMV multiplication in BHK-21 cells following infection at a low MOI and a high MOI (Fig. 1). The concentrations of ribavirin that produced a decrease of 99% in the yield of infectious progeny (99% inhibitory concentrations [IC_{99}]) were 4.28 ± 0.24 μ M for the infections carried out with an MOI of 0.01 PFU/cell and 12.83 ± 0.61 μ M for the infections carried out with an MOI of 10 PFU/cell. Thus, the inhibitory effect of ribavirin on LCMV was more pronounced in infections carried out at a low MOI.

Ribavirin has been recognized as a mutagen for several RNA viruses (reviewed in reference 37). To investigate whether ribavirin could exert a dual inhibitory and mutagenic activity during LCMV replication, single-step infections were carried out at an MOI of 10 PFU/cell in the presence and absence of 20 μ M or 100 μ M ribavirin. The progeny infectivity, progeny RNA, mutant spectrum complexity, and types of mutations in the progeny populations were analyzed. The results (Table 1) confirm a strong inhibitory activity of ribavirin, with

TABLE 1. Quasispecies analysis of LCMV populations produced in the presence or absence of ribavirin and/or guanosine^a

Ribavirin concn (μ M)	Guanosine concn (μ M)	Progeny infectivity (PFU/ml) ^b	Progeny RNA (mol/ml) ^c	Specific infectivity (PFU/mol of RNA) ^d	Mutation frequency ^e	Shannon entropy ^f	No. of nucleotides sequenced ^g	Mutation types									
								Transition			Transversion ^h						
								A→G	G→A	U→C	C→A	A→C	C→G	G→U	U→A	A→U	U→G
0 ⁱ	0	$(3.7 \pm 0.7) \times 10^6$	$(1.0 \pm 0.01) \times 10^{10}$	3.7×10^{-4}	4.8×10^{-4}	0.29	34,720	10	1	4	0	2	0	0	1	0	0
20 ^j	0	$(6.3 \pm 5.0) \times 10^4$	$(4.6 \pm 0.09) \times 10^8$	1.3×10^{-5}	1.1×10^{-3}	0.73	81,200	30	26	12	17	0	2	6	5	4	0
100 ^k	0	ND	$(1.9 \pm 0.02) \times 10^8$	1.7×10^{-7}	4.4×10^{-4}	0.29	40,880	11	1	3	0	2	3	0	0	0	0
0 ⁱ	100	$(2.0 \pm 0.6) \times 10^6$	$(1.5 \pm 0.1) \times 10^{10}$	1.3×10^{-4}	6.1×10^{-4}	0.30	44,240	11	1	11	0	3	0	0	1	0	0
20 ^j	100	$(1.2 \pm 0.02) \times 10^6$	$(8.7 \pm 1.0) \times 10^9$	1.3×10^{-4}	5.4×10^{-4}	0.32	40,320	9	1	7	5	1	0	0	0	0	1
100 ^k	100	$(1.2 \pm 0.2) \times 10^5$	$(1.1 \pm 0.08) \times 10^{10}$	1.0×10^{-5}	8.4×10^{-4}	0.46	41,440	10	5	15	1	1	2	0	0	0	1

^a BHK-21 cell monolayers were infected at an MOI of 10 PFU/cell, and the infection was allowed to proceed in the presence of 0, 20, or 100 μ M ribavirin and 0 or 100 μ M guanosine, as detailed in Materials and Methods. ^b Titer (see Materials and Methods) of LCMV populations obtained at 48 h postinfection (hpi). The corresponding background (time zero; after washing the monolayers) for each infection has been subtracted from the values obtained at subsequent times. ND, not detectable (the limit of detection is 33 PFU/ml).

^c RNA quantification (described in Materials and Methods) of LCMV populations obtained at 48 hpi. The corresponding background (time zero; after washing the monolayers) for each infection has been subtracted from the values obtained at subsequent times.

^d Ratio between virus titer and number of viral RNA molecules per ml of the LCMV populations obtained at 48 hpi.

^e Average number of mutations per nucleotide relative to the corresponding consensus sequence.

^f Shannon entropy (S) is a measure of the number of different molecules in the mutant spectrum of the quasispecies. It is calculated by the formula $S = -[\sum (p_i \times \ln p_i)] / \ln N$, in which p_i is the frequency of each sequence in the quasispecies and N is the total number of sequences compared.

^g Residues 3654 to 4260 (560 nucleotides) from the large (L) gene were sequenced.

^h Omitted transversions were not represented in the sequences analyzed.

ⁱ Differences in the mutation frequency and Shannon entropy between the population produced in the absence of ribavirin and in the presence of 20 μ M ribavirin and also between the population produced in the presence of 20 μ M and 100 μ M ribavirin were statistically significant ($P < 0.05$ by χ^2 test).

^j Differences in the mutation frequency and Shannon entropy between the three populations were not statistically significant ($P = 0.8165$ by χ^2 test).

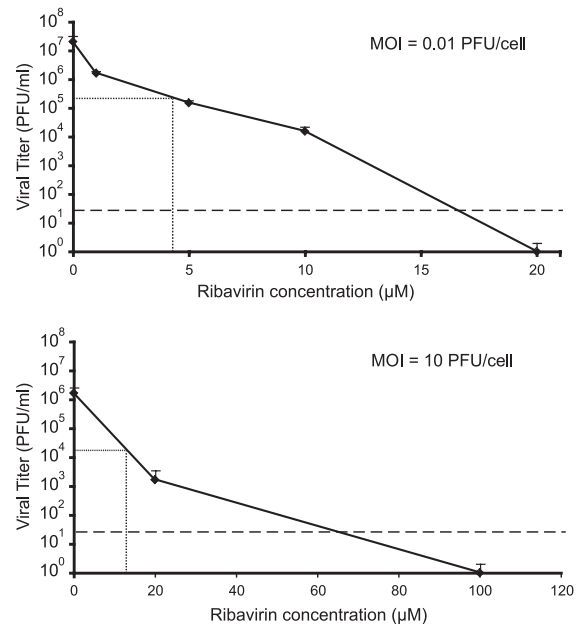


FIG. 1. Inhibition of LCMV replication by ribavirin. BHK-21 cells were infected with LCMV Armstrong (Arm) 53b at an MOI of either 0.01 PFU/cell or 10 PFU/cell. Viral titers were determined at 48 h postinfection (p.i.) in triplicate, and standard deviations (error bars) are given. The horizontal and vertical lines indicate the viral titer and ribavirin concentration that yield the IC_{99} values (concentration of ribavirin that produces a 99% inhibition of LCMV infectious progeny production), given in the text as the average of triplicate determinations. The broken line indicates the limit of detection of LCMV infectivity. Note the different scale of the abscissa in the two plots. Procedures for LCMV infection in the presence or absence of ribavirin and for the determination of infectivity by plaque assays are detailed in Materials and Methods.

at least a 10^6 -fold reduction of virus titer and 10^2 -fold reduction of viral RNA levels in the presence of 100 μ M ribavirin. It must be noted that the specific infectivity of progeny LCMV decreased 28.5-fold in the infection carried out in the presence of 20 μ M ribavirin and at least 2,170-fold in the presence of 100 μ M ribavirin (considering the limit of detection of infectivity [Table 1]). The significant decrease of specific infectivity may be relevant to the mechanism of inhibition of LCMV replication by ribavirin (see Discussion). The mutation frequency among components of the LCMV population passaged in the presence of 20 μ M ribavirin was significantly higher (2.3-fold; $P = 0.0385$ by χ^2 test) than in the population passaged in the absence of ribavirin. In contrast, no increase in mutation frequency was detected in the mutant spectrum of LCMV replicated in the presence of 100 μ M ribavirin compared to LCMV replicated in the absence of ribavirin. The difference of population complexity was also reflected in the Shannon entropy (Table 1). Furthermore, examination of the mutation types shows that the infection in the presence of 20 μ M ribavirin, but not in the presence of 100 μ M ribavirin, led to a specific increase of G→A and C→U transitions ($P < 0.05$ by χ^2 test) (Table 1). G→A and C→U are the types of

mutations previously associated with ribavirin mutagenesis (3, 5, 18). In the population passaged in the absence of ribavirin, A→G and U→C transitions were more frequent than G→A and C→U transitions, and the same bias was present in the progeny of the infection carried out in the presence of 100 μ M ribavirin (Table 1). In all cases, transitions were 3- to 5-fold more frequent than transversions. The results strongly suggest that ribavirin can exert a dual mutagenic and inhibitory activity on LCMV.

Effect of guanosine on the inhibitory and mutagenic activity of ribavirin exerted on LCMV. In the cell, ribavirin is phosphorylated into ribavirin mono-, di-, and triphosphate (RMP, RDP, and RTP, respectively) by cellular enzymes (91, 98). RMP acts as a competitive inhibitor of inosine monophosphate dehydrogenase (IMPDH) and reduces the intracellular concentration of GTP (33, 90, 91). RTP is used as a substrate by the RNA-dependent RNA polymerases (RdRps) of picornaviruses in place of GTP or ATP during RNA elongation resulting in mutagenesis of viral RNA (3, 18, 30, 37, 69, 87). The addition of guanosine to the cell culture medium can restore intracellular GTP levels despite the presence of RMP (5, 50, 54, 98). To study whether GTP levels were involved in the inhibition and mutagenesis of LCMV by ribavirin, single-step infections were carried out in the presence or absence of ribavirin and in the presence of 100 μ M guanosine, a concentration that compensates for the decrease of GTP produced by ribavirin treatment of BHK-21 cells (5). The results (Fig. 2 and Table 1) show that the presence of guanosine in the culture medium greatly reduced the inhibition of infectious LCMV progeny production by 100 μ M ribavirin (16.6-fold decrease of infectious progeny production in the presence of guanosine versus at least a 112,121-fold reduction in the absence of guanosine [Table 1]). Guanosine also prevented the increase of mutation frequency and Shannon entropy associated with the presence of 20 μ M ribavirin and abolished the differences in the frequency of transition types observed between the mutant spectra of LCMV passaged in the presence and absence of 20 μ M ribavirin (Table 1). Thus, the inhibitory and mutagenic activities of ribavirin exerted on LCMV during virus replication were largely overcome by the presence of guanosine in the culture medium, suggesting that inhibition and mutagenesis of LCMV by ribavirin were mediated or enhanced by low intracellular GTP levels.

Effect of treatment with mycophenolic acid on LCMV multiplication in cultured cells. Low intracellular GTP caused by ribavirin treatment may favor misincorporation of AMP (if RTP is not a substrate for LCMV polymerase) or both AMP and RMP (if RTP is a substrate for the polymerase) in place of GMP. To quantitate the mutagenic activity evoked by low intracellular GTP levels in the absence of ribavirin, we conducted LCMV infections in the presence or absence of MPA, an inhibitor of IMPDH that cannot be incorporated into nucleic acids (33). We conducted single-step LCMV infections (MOI of 10 PFU/cell) in the presence or absence of 5 and 30 μ M MPA, as 30 μ M MPA results in a decrease of intracellular GTP levels at least equal to the decrease produced by 500 μ M ribavirin (5). The infections were done in the presence or absence of 100 μ M guanosine. The results (Table 2) show that MPA reduced LCMV infectious progeny production by 2.1- to 2.3-fold, an inhibition which is at least 48,000-fold lower than

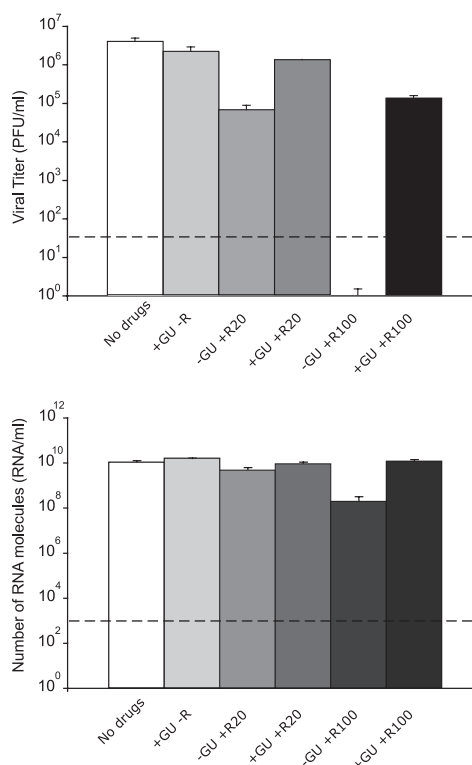


FIG. 2. LCMV progeny production in the presence or absence of ribavirin (R) and guanosine (GU). BHK-21 cells were infected with LCMV Arm 53b at an MOI of 10 PFU/cell either in the absence of drugs or in the presence of 100 μ M guanosine (+GU) or 20 μ M or 100 μ M ribavirin (+R20 and +R100, respectively) (-R, no ribavirin), as indicated for each column. LCMV infectivity (top panel) and number of LCMV RNA molecules measured by quantitative RT-PCR (bottom panel) were determined in the cell culture supernatant at 48 h p.i. Background values (PFU/ml and RNA/ml measured at time zero) have been subtracted from each titer and number of RNA molecules, respectively. The broken lines indicate the limit of detection for LCMV infectivity and the number of RNA molecules. Values are means of triplicate determinations, and standard deviations are given. Procedures for infections, titration by plaque assay and LCMV RNA quantification are described in Materials and Methods.

the inhibition produced by ribavirin (compare Tables 1 and 2). Guanosine totally compensated for the inhibition exerted by MPA on LCMV progeny production (Table 2). The presence of MPA did not lead to any increase in mutant spectrum complexity, a result which contrasts with that obtained with 20 μ M ribavirin (Tables 1 and 2). In fact, the mutation frequency and Shannon entropy of the LCMV that replicated in the presence of 30 μ M MPA decreased 4.3- and 3.6-fold, respectively, relative to the populations replicated in the absence of MPA (Table 2). Thus, in contrast to ribavirin, MPA is not mutagenic for LCMV. The decrease of mutant spectrum complexity in the presence of MPA was associated mainly with a lower frequency of A→G and U→C transitions, the transition types that LCMV tends to produce during replication. This lower frequency is expected if this mutational tendency is fa-

TABLE 2. Quasispecies analysis of LCMV populations produced in the presence or absence of mycophenolic acid and guanosine^a

Mycophenolic acid concn (μM)	Guanosine concn (μM)	Progeny infectivity (PFU/ml) ^b	Progeny RNA (mol/ml) ^c	Specific infectivity (PFU/mol of RNA) ^d	Mutation frequency ^e	Shannon entropy ^f	No. of nucleotides sequenced ^g	Mutation types						
								Transition				Transversion ^h		
								A→G	G→A	U→C	C→U	C→A	A→C	A→U
0	0	$(1.9 \pm 0.5) \times 10^5$	$(1.0 \pm 0.01) \times 10^{10}$	1.9×10^{-5}	4.8×10^{-4}	0.29	34,720	10	1	4	0	2	0	1
	100	$(1.7 \pm 0.5) \times 10^5$	$(1.5 \pm 0.1) \times 10^{10}$	1.1×10^{-5}	6.1×10^{-4}	0.30	44,240	11	1	11	0	3	0	1
5	0	$(8.1 \pm 3.6) \times 10^4$	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	100	$(2.4 \pm 0.2) \times 10^5$	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
30	0	$(9.0 \pm 2.0) \times 10^4$	$(3.7 \pm 0.3) \times 10^9$	2.4×10^{-5}	1.1×10^{-4}	0.08	53,200	1	2	0	2	0	1	1
	100	$(5.5 \pm 1.2) \times 10^5$	$(1.5 \pm 0.0) \times 10^{10}$	3.6×10^{-5}	1.9×10^{-4}	0.12	53,200	3	3	1	0	0	1	0

^a BHK-21 cell monolayers were infected at an MOI of 10 PFU/cell, and the infection was allowed to proceed in the presence of 0, 5 or 30 μM mycophenolic acid (MPA) and 0 or 100 μM guanosine, as detailed in Materials and Methods. ND, not determined.

^b Titer (see Materials and Methods) of LCMV populations obtained at 48 hpi. The corresponding background (time zero; after washing the monolayers) for each infection has been subtracted from the remaining collected times.

^c RNA quantification (described in Materials and Methods) of LCMV populations obtained at 48 hpi. The corresponding background (time zero; after washing the monolayers) for each infection has been subtracted from the values obtained at subsequent times.

^d Ratio between virus titer and number of viral RNA molecules per ml of LCMV population obtained at 48 hpi.

^e Average number of mutations per nucleotide relative to the corresponding consensus sequence.

^f Shannon entropy (S) is a measure of the number of different molecules in the mutant spectrum of the quasispecies. It is calculated by the formula $S = -[\sum (p_i \times \ln p_i)] / \ln N$, in which p_i is the frequency of each sequence in the quasispecies and N is the total number of sequences compared.

^g Residues 3654 to 4260 (560 nucleotides) from the L gene were sequenced.

^h Omitted transversions are not represented in the sequences analyzed.

vored by high intracellular GTP concentrations during LCMV replication. Surprisingly, the amount of LCMV progeny RNA decreased significantly in the virus produced in the presence of MPA ($P < 0.05$ by Student's t test) (Table 2). As a consequence, the specific infectivity of the LCMV produced in these infections was 1.2- to 3.2-fold higher than that of the population generated in the absence of drugs. Since mutagenesis of RNA viruses is associated with decreases in specific infectivity (2, 3, 34, 35, 39, 40, 76, 77), the increase in specific infectivity that the virus undergoes in the presence of MPA and guanosine reinforces the conclusion of the absence of mutagenic activity of MPA on LCMV. How alterations of intracellular GTP levels can modify the specific infectivity of LCMV is unknown (see Discussion). Thus, the mutagenic activity of ribavirin cannot be attributed to the inhibition of IMPDH exerted by RMP.

Assessment of ribavirin mutagenic activity and its prevention by guanosine during serial LCMV infections in cultured cells. The mutagenic activity of ribavirin on LCMV and its compensation by guanosine (Fig. 2 and Table 1) were studied in single-step infections carried out at a high MOI. The IC_{99} for ribavirin was 3-fold higher in the infections carried out at an MOI of 10 PFU/cell than at 0.01 PFU/cell (Fig. 1). Infection at a high MOI promotes accumulation of defective interfering (DI) particles of LCMV (80, 95, 96), whereas infection at a low MOI acts as a filter to eliminate DI particles whose replication is dependent on standard, infectious LCMV. Previous studies showed that a subset of defective but RNA replication-competent LCMVs termed defectors could interfere with replication of standard LCMV and contribute to virus extinction (40, 42, 63). Since the proportion of defector LCMV genomes increases with moderate intensities of mutagenesis (40), it was important to ascertain that the mutagenic activity of ribavirin observed during LCMV infection at a high MOI was not dependent on DI particles and defector genomes. To achieve this aim, we conducted parallel infections of BHK-21 cells at a low (0.01 PFU/cell) and high (10 PFU/cell) MOI in the presence of

increasing concentrations of ribavirin (Fig. 3). Quantification of infectivity and viral RNA after the first passage shows that the inhibition of infectious progeny production by ribavirin measured at 24 h and 48 h postinfection (p.i.) was 100- to 300-fold higher at a low MOI than at a high MOI (Fig. 3A and B). In contrast, the decrease in viral RNA progeny production by ribavirin was less pronounced at 48 h p.i. and almost absent at 24 h p.i. at a low MOI (Fig. 3C and D).

The different effects of ribavirin on the yield of infectious units and viral genomes resulted in a significant decrease of specific infectivity due to ribavirin activity at an MOI of 0.01 PFU/cell at high concentrations of ribavirin (100 μM), not at low concentrations of ribavirin (5 and 20 μM) (Fig. 3E). The decrease in specific infectivity in the infection carried out in the presence of 100 μM ribavirin was diminished at a high MOI (Fig. 3F). The results with an MOI of 10 PFU/cell are in agreement with those reported in the previous series of independent infections described in Table 1.

A total of nine passages were performed at a low MOI in the presence of 10 μM ribavirin to ensure continued virus infectivity (absence of extinction) over nine passages. Evolution of the infectivity values in the presence or absence of ribavirin and guanosine in the course of the nine passages indicated an inhibitory activity of ribavirin that decreased with passage number and that was largely compensated for by the presence of guanosine at all passages (Fig. 4 and Table 3). The yields of infectivity and viral RNA at passage 1 were significantly reduced by 10 μM ribavirin, resulting in a 15-fold increase in specific infectivity. At passage 9, the inhibition by ribavirin diminished and no difference in specific infectivity was detected (Fig. 4 and Table 3). The mutation frequency and Shannon entropy at passage 9 were significantly higher in the virus passaged in the presence of ribavirin than in the virus passaged in the absence of ribavirin ($P < 0.005$ by χ^2 test), and the increase was associated with G→A and C→U transitions, the transition types expected from ribavirin mutagenesis. Guanosine compensated for the decrease of infectious progeny pro-

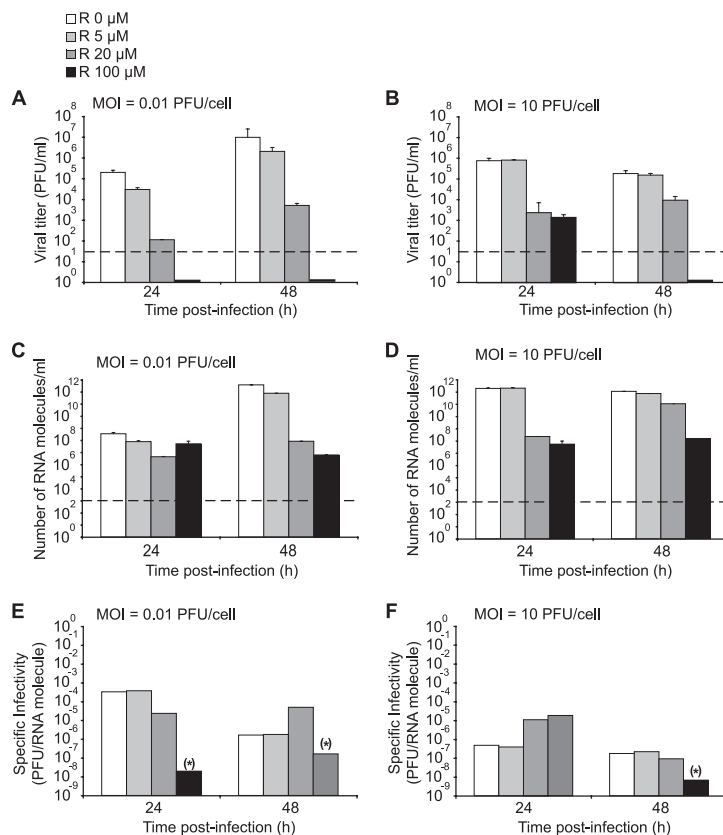


FIG. 3. Inhibition of LCMV progeny production by ribavirin. BHK-21 cells were infected with LCMV Arm 53b at an MOI of either 0.01 PFU/cell (left panels) or 10 PFU/cell (right panels) in the presence of the indicated concentrations of ribavirin (R) (0 to 100 μ M). The broken lines indicate the limit of detection of LCMV infectivity and number of RNA molecules. Viral titers obtained in the presence of 100 μ M ribavirin at an MOI of 0.01 PFU/cell and at 48 h at an MOI of 10 PFU/cell were below the limit of detection (indicated by a short black bar next to the abscissa). Background values (PFU/ml and RNA/ml measured at time zero) have been subtracted from each titer and number of RNA molecules, respectively. (A to F) Virus titers (A and B) and number of LCMV RNA molecules measured by quantitative RT-PCR (C and D) in the supernatants of the infected cultures at 24 and 48 h postinfection were used to calculate the corresponding specific infectivities (E and F). The asterisks in parentheses indicate that a specific infectivity was calculated assuming 1 PFU/ml, since the virus titer was below the limit of detection. Procedures for infections, titration by plaque assay, and LCMV RNA quantification are described in Materials and Methods.

duction and progeny RNA levels associated with the presence of ribavirin but compensated only partially for the increase of mutant spectrum complexity evoked by ribavirin (Table 3). Thus, several passage regimes indicate that ribavirin displays a dual inhibitory and mutagenic activity for LCMV during virus replication in cell culture, and both activities can be either totally or partially prevented by the presence of guanosine in the culture medium. The mutagenic activity of ribavirin on LCMV cannot be explained as a result of the inhibition of IMPDH by RMP.

DISCUSSION

The results described in the present study establish ribavirin as a mutagenic agent for LCMV replicating in cell culture. It remains to be determined whether this mutagenic activity of ribavirin can also be observed in LCMV-infected mice and whether these findings could be extended to other arenavi-

rus. Ribavirin has been shown to be mutagenic for several RNA viruses (3, 16, 17, 38, 54, 84, 87). However, for some other RNA viruses tested, ribavirin did not exhibit noticeable mutagenic activity (57, 59). Ribavirin is currently the only drug therapy recommended to treat arenavirus infections, but its mechanism of action has not been entirely elucidated. There is, however, evidence indicating that ribavirin likely targets different steps of the arenavirus life cycle (58, 75).

We have now provided evidence that at subinhibitory concentrations, ribavirin exerts a mutagenic activity on LCMV. One could envision at least two distinct mechanisms by which ribavirin could exert a mutagenic activity on LCMV. (i) RMP could mediate the inhibition of IMPDH, which could result in depletion of intracellular GTP (33, 91), which would facilitate incorporation of ATP instead of GTP opposite C in the template (53, 65). (ii) RTP might be used as a substrate by the arenavirus polymerase and be incorporated instead of ATP or

TABLE 3. Quasispecies analysis of LCMV populations subjected to nine low-MOI passages in the presence or absence of ribavirin and guanosine^a

Passage	Ribavirin concn (μM)	Guanosine concn (μM)	Progeny infectivity (PFU/ml) ^b	Progeny RNA (mol/ml) ^c	Specific infectivity (PFU/mol of RNA) ^d	Mutation frequency ^e	Shannon entropy ^f	No. of nucleotides sequenced ^g	Mutation types							
									Transition				Transversion ^h			
									A→G	G→A	U→C	C→U	U→A	C→A	G→U	A→C
Passage 1	0 ⁱ	0	(1.5 ± 0.8) × 10 ⁶	(4.9 ± 0.9) × 10 ⁹	3.0 × 10 ⁻⁴	1.1 × 10 ⁻⁴	0.08	53,200	1	2	1	1	0	0	0	1
	10 ^j	0	(9.9 ± 0.1) × 10 ⁴	(2.2 ± 0.6) × 10 ⁷	4.5 × 10 ⁻³	2.0 × 10 ⁻⁴	0.13	44,800	2	2	2	0	0	2	1	0
Passage 9	0 ⁱ	0	(8.0 ± 2.2) × 10 ⁶	(5.5 ± 0.2) × 10 ¹⁰	1.4 × 10 ⁻⁴	1.9 × 10 ⁻⁴	0.12	48,160	5	1	1	0	0	1	1	0
		100	(1.1 ± 0.2) × 10 ⁷	(1.6 ± 0.2) × 10 ¹⁰	6.8 × 10 ⁻⁴	1.4 × 10 ⁻⁴	0.09	49,280	3	3	1	0	0	0	0	0
Passage 10	0 ⁱ	0	(1.7 ± 0.8) × 10 ⁶	(1.7 ± 0.2) × 10 ¹⁰	1.0 × 10 ⁻⁴	1.0 × 10 ⁻³	0.37	106,960	1	32	5	70	1	1	0	2
		100	(8.3 ± 1.2) × 10 ⁶	(9.4 ± 0.9) × 10 ¹⁰	8.8 × 10 ⁻⁵	5.2 × 10 ⁻⁴	0.28	96,320	17	15	7	10	0	0	0	1

^a Nine serial passages of LCMV in BHK-21 cells at an MOI of 0.01 PFU/cell in the presence or absence of 10 μM ribavirin and/or 100 μM guanosine were performed, as detailed in Materials and Methods. Passages one and nine are analyzed.

^b Titer (see Materials and Methods) of LCMV populations obtained at 48 hpi. The corresponding background (time zero; after washing the monolayers) for each infection has been subtracted from the remaining collected times.

^c RNA quantification (described in Materials and Methods) of LCMV populations obtained at 48 hpi. The corresponding background (time zero; after washing the monolayers) for each infection has been subtracted from the values obtained at subsequent times.

^d Ratio between virus titer and number of viral RNA molecules per ml of LCMV populations obtained at 48 hpi.

^e Average number of mutations per nucleotide relative to the corresponding consensus sequence.

^f Shannon entropy (S) is a measure of the number of different molecules in the mutant spectrum of the quasispecies. It is calculated by the formula $S = -[\sum (p_i \times \ln p_i)] / \ln N$, in which p_i is the frequency of each sequence in the quasispecies and N is the total number of sequences compared.

^g Residues 3654 to 4260 (560 nucleotides) from the L gene were sequenced.

^h Omitted transversions were not represented in the sequences analyzed.

ⁱ Differences in the mutation frequency and Shannon entropy between the population subjected to 9 passages in the presence of 10 μM ribavirin and any other population analyzed were statistically significant ($P < 0.05$ by χ^2 test).

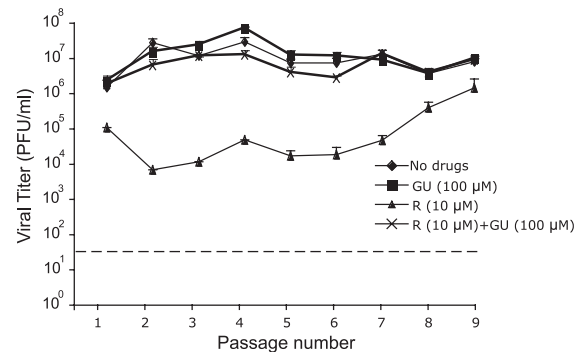


FIG. 4. Infectious progeny production during serial passages of LCMV in the presence of ribavirin and guanosine. BHK-21 cells were infected with LCMV Arm 53b at an MOI of 0.01 PFU/cell either in the presence or absence of 10 μM ribavirin (R) or 100 μM guanosine (GU), or both, as indicated. The progeny virus was used to infect a fresh BHK-21 cell monolayer under the same conditions, and infection was repeated for a total of nine passages. Virus titers were determined in triplicate in the supernatant of the infected cultures at 48 h p.i. The broken line indicates the limit of detection of LCMV infectivity. Procedures for infections in the presence or absence of drugs and titration by plaque assay are described in Materials and Methods.

GTP during arenavirus RNA synthesis. The subsequent ambiguous reading within the template RNA of reading ribavirin as G or A would result in increased numbers of mutations during virus RNA replication as reported for picornaviruses (3, 17, 18, 87). These two mechanisms are not mutually exclusive, and both could contribute to the mutagenic activity of ribavirin. Our finding that MPA at concentrations in excess of those required to produce the same depletion of GTP levels as found with 100 μM ribavirin in BHK-21 cells (5) did not display any detectable mutagenic activity for LCMV (Table 2) supports the conclusion that RMP-mediated inhibition of IMPDH cannot account for the mutagenic activity of ribavirin on LCMV.

Guanosine largely reversed the inhibition of LCMV progeny production exerted by either MPA or ribavirin (Fig. 2 and 4 and Tables 1 and 3). Interestingly, the ribavirin-induced increase in mutation frequency and Shannon entropy observed in infections done at a high, but not at a low, MOI were prevented by the guanosine treatment (Tables 1 and 3). At the concentration used, guanosine restores normal intracellular GTP levels in BHK-21 cells (5), suggesting that the inhibitory activity of ribavirin on LCMV is likely associated with decreased GTP levels caused by RMP-mediated inhibition of IMPDH, whereas the mutagenic activity of ribavirin likely reflects its incorporation by the arenavirus polymerase into nascent RNA molecules during virus replication. A direct demonstration of a competition between RTP and GTP or ATP during LCMV RNA synthesis will require *in vitro* assays to assess the incorporation of RTP by the LCMV RdRp and the isolation and mapping of ribavirin resistance mutations in LCMV. It is worth noting that the observed decrease in ribavirin-mediated inhibition of LCMV replication during serial passages in the presence of 10 μM ribavirin suggests the possible selection of an LCMV population with decreased sensitivity to ribavirin, whose mutant spectrum tends to become

enriched in transition mutations (Fig. 4 and Table 3). This is a subject currently under investigation in our laboratory.

Our results raise the question of whether the inhibitory and mutagenic activities of ribavirin on LCMV are independent or related. It is plausible that the strong inhibition of LCMV production at high ribavirin concentrations was due to lethal mutagenesis. Evidence against this possibility is the fact that viral populations grown in the presence or absence of a high concentration (100 μ M) of ribavirin exhibited similar mutation frequencies and Shannon entropies (Table 1). A counterargument, however, is that highly mutated genomes do not survive to be analyzed, and therefore, the genomes subjected to analysis were mainly genomes that underwent none, or minimal, replication. It should be noted that LCMV progeny produced in the presence of 100 μ M ribavirin displayed a severe reduction in specific infectivity (Fig. 3E and F), a hallmark of the transition of viruses into error catastrophe (34, 40).

The findings presented here open the possibility that the antiarenavirus activity of ribavirin might be exerted at least in part through its mutagenic activity. There is evidence that in whole organisms, ribavirin accumulates in blood rather than in organs (15, 25, 47). Therefore, it is likely that in tissues where LCMV replicates ribavirin, it is present at subinhibitory, rather than inhibitory, concentrations. Notably, the mutagenic activity of ribavirin could be observed at subinhibitory concentrations of ribavirin. Nevertheless, it may be difficult to associate a therapeutic activity of ribavirin with mutagenesis during treatment of human arenavirus infections, as exemplified by the conflicting evidence in the case of ribavirin treatment of hepatitis C virus (HCV) infections (8, 14, 20, 61, 78), despite evidence of mutagenesis in HCV replicon systems (16, 48, 79, 97). The role of mutagenesis versus inhibition in the anti-LCMV activity of ribavirin remains an open issue.

Whether an antiviral drug acts mainly as an inhibitor of virus multiplication or as a mutagen is highly relevant for the design of the optimal treatment protocols. Combination therapy is generally accepted as a necessity to prevent or delay selection of inhibitor-resistant viral mutants (10, 19, 46, 52, 56, 70, 71, 93). However, when a mutagenic agent is one of the components of drug therapy, the sequential administration of giving the inhibitor first and then the mutagenic agent can be more effective than the corresponding combination treatment (77). Therefore, the use of ribavirin in combination therapy with novel antiarenavirus drugs yet to be developed would benefit from determining the contribution of ribavirin-mediated mutagenic effects to its overall antiarenavirus activity. Certainly, the demonstration of viral mutagenesis by ribavirin in arenavirus-infected individuals would not exclude a beneficial effect of ribavirin by any of the alternative antiviral mechanisms displayed by this nucleoside analogue (38, 58, 75, 90).

ACKNOWLEDGMENTS

Work at the Centro de Biología Molecular Severo Ochoa was supported by grant BFU2008-02816/BMC from the Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN) and Fundación R. Areces. The Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd) is funded by Instituto de Salud Carlos III. Work at the Centro de Investigación en Sanidad Animal was supported by grants RYC-2010-06516 and AGL2004-0049 and by EPIZONE (contract FOOD-CT-2006-016236). Work at The Scripps Research Institute is supported by NIH grant RO1 AI047140 to J.C.D.L.T.

We thank A. I. de Ávila for expert technical assistance, H. Tejedo for help with statistics, and C. Perales and J. Sheldon for critically reading the manuscript.

REFERENCES

- Acosta, E. G., et al. 2008. Dehydroepiandrosterone, epiandrosterone and synthetic derivatives inhibit Junin virus replication in vitro. *Virus Res.* **135**: 203–212.
- Agudo, R., et al. 2008. Molecular characterization of a dual inhibitory and mutagenic activity of 5-fluorouridine triphosphate on viral RNA synthesis. Implications for lethal mutagenesis. *J. Mol. Biol.* **382**:652–666.
- Agudo, R., et al. 2010. A multi-step process of viral adaptation to a mutagenic nucleoside analogue by modulation of transition types leads to extinction-escape. *PLoS Pathog.* **6**(8):e1001072.
- Ahmed, R., et al. 1988. Genetic analysis of in vivo-selected viral variants causing chronic infection: importance of mutation in the L RNA segment of lymphocytic choriomeningitis virus. *J. Virol.* **62**:3301–3308.
- Airaksinen, A., N. Pariente, L. Menendez-Arias, and E. Domingo. 2003. Curing of foot-and-mouth disease virus from persistently infected cells by ribavirin involves enhanced mutagenesis. *Virology* **311**:339–349.
- Anderson, J. P., R. Daifuku, and L. A. Loeb. 2004. Viral error catastrophe by mutagenic nucleosides. *Annu. Rev. Microbiol.* **58**:183–205.
- Arias, A., et al. 2008. Determinants of RNA-dependent RNA polymerase (in)fidelity revealed by kinetic analysis of the polymerase encoded by a foot-and-mouth disease virus mutant with reduced sensitivity to ribavirin. *J. Virol.* **82**:12346–12355.
- Asahina, Y., et al. 2005. Mutagenic effects of ribavirin and response to interferon/ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C. *J. Hepatol.* **43**:623–629.
- Barton, L. L. 1996. Lymphocytic choriomeningitis virus: a neglected central nervous system pathogen. *Clin. Infect. Dis.* **22**:197.
- Bonhoeffer, S., R. M. May, G. M. Shaw, and M. A. Nowak. 1997. Virus dynamics and drug therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**:6971–6976.
- Bowen, M. D., C. J. Peters, and S. T. Nichol. 1997. Phylogenetic analysis of the Arenaviridae: patterns of virus evolution and evidence for cospeciation between arenaviruses and their rodent hosts. *Mol. Phylogenet. Evol.* **8**:301–316.
- Briese, T., et al. 2009. Genetic detection and characterization of Lujo virus, a new hemorrhagic fever-associated arenavirus from southern Africa. *PLoS Pathog.* **5**:e1000455.
- Buchmeier, M. J., J. C. de la Torre, and C. J. Peters. 2007. Arenaviridae: the viruses and their replication, p. 1791–1827. In D. M. Knipe and P. M. Howley (ed.), *Fields virology*, 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA.
- Chevaliez, S., R. Brillet, E. Lazaro, C. Hezode, and J. M. Pawlotsky. 2007. Analysis of ribavirin mutagenicity in human hepatitis C virus infection. *J. Virol.* **81**:7732–7741.
- Connor, E., et al. 1993. Safety, tolerance, and pharmacokinetics of systemic ribavirin in children with human immunodeficiency virus infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**:532–539.
- Contreras, A. M., et al. 2002. Viral RNA mutations are region specific and increased by ribavirin in a full-length hepatitis C virus replication system. *J. Virol.* **76**:8505–8517.
- Crotty, S., C. E. Cameron, and R. Andino. 2001. RNA virus error catastrophe: direct molecular test by using ribavirin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**:6895–6900.
- Crotty, S., et al. 2000. The broad-spectrum antiviral ribonucleotide, ribavirin, is an RNA virus mutagen. *Nat. Med.* **6**:1375–1379.
- Cubero, M., et al. 2008. Naturally occurring NS3-protease-inhibitor resistant mutant A156T in the liver of an untreated chronic hepatitis C patient. *Virology* **370**:237–245.
- Cuevas, J. M., F. Gonzalez-Candelas, A. Moya, and R. Sanjuan. 2009. Effect of ribavirin on the mutation rate and spectrum of hepatitis C virus in vivo. *J. Virol.* **83**:5760–5764.
- Cummings, K. J., et al. 2001. Interferon and ribavirin vs interferon alone in the re-treatment of chronic hepatitis C previously nonresponsive to interferon: a meta-analysis of randomized trials. *JAMA* **285**:193–199.
- Davis, G. L., et al. 1998. Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin for the treatment of relapse of chronic hepatitis C. International Hepatitis Interventional Therapy Group. *N. Engl. J. Med.* **339**:1493–1499.
- Di Bisceglie, A. M., J. Thompson, N. Smith-Wilkaitis, E. M. Brunt, and B. R. Bacon. 2001. Combination of interferon and ribavirin in chronic hepatitis C: re-treatment of nonresponders to interferon. *Hepatology* **33**:704–707.
- Domingo, E. (ed.). 2005. Virus entry into error catastrophe as a new antiviral strategy. *Virus Res.* **107**:115–228.
- Dushenko, G., D. Nelson, and K. R. Reddy. 2008. Ribavirin considerations in treatment optimization. *Antivir. Ther.* **13**(Suppl. 1):23–30.
- Dutko, F. J., and M. B. A. Oldstone. 1983. Genomic and biologic variation among commonly used lymphocytic choriomeningitis virus strains. *J. Gen. Virol.* **64**:1689–1694.
- Emonet, S., J. J. Lemasson, J. P. Gonzalez, X. de Lamballerie, and R. N.

- Charrel. 2006. Phylogeny and evolution of old world arenaviruses. *Virology* 350:251–257.
28. Emonet, S. F., J. C. de la Torre, E. Domingo, and N. Sevilla. 2009. Arenavirus genetic diversity and its biological implications. *Infect. Genet. Evol.* 9:417–429.
 29. Enria, D. A., and J. I. Maiztegui. 1994. Antiviral treatment of Argentine hemorrhagic fever. *Antiviral Res.* 23:23–31.
 30. Ferrer-Orta, C., et al. 2010. Structure of foot-and-mouth disease virus mutant polymerases with reduced sensitivity to ribavirin. *J. Virol.* 84:6188–6199.
 31. Fischer, S. A., et al. 2006. Transmission of lymphocytic choriomeningitis virus by organ transplantation. *N. Engl. J. Med.* 354:2235–2249.
 32. Fox, E. J., and L. A. Loeb. 2010. Lethal mutagenesis: targeting the mutator phenotype in cancer. *Semin. Cancer Biol.* 20:353–359.
 33. Franklin, T. J., and J. M. Cook. 1969. The inhibition of nucleic acid synthesis by mycophenolic acid. *Biochem. J.* 113:515–524.
 34. González-López, C., A. Arias, N. Pariente, G. Gómez-Mariano, and E. Domingo. 2004. Preextinction viral RNA can interfere with infectivity. *J. Virol.* 78:3319–3324.
 35. González-López, C., G. Gómez-Mariano, C. Escarmís, and E. Domingo. 2005. Invariant aphthovirus consensus nucleotide sequence in the transition to error catastrophe. *Infect. Genet. Evol.* 5:366–374.
 36. Gowen, B. B., et al. 2008. Treatment of late stage disease in a model of arenaviral hemorrhagic fever: T-705 efficacy and reduced toxicity suggests an alternative to ribavirin. *PLoS One* 3:e3725.
 37. Graci, J. D., and C. E. Cameron. 2006. Mechanisms of action of ribavirin against distinct viruses. *Rev. Med. Virol.* 16:37–48.
 38. Graci, J. D., and C. E. Cameron. 2008. Therapeutically targeting RNA viruses via lethal mutagenesis. *Future Virol.* 3:553–566.
 39. Grande-Pérez, A., G. Gómez-Mariano, P. R. Lowenstein, and E. Domingo. 2005. Mutagenesis-induced, large fitness variations with an invariant arenavirus consensus genomic nucleotide sequence. *J. Virol.* 79:10451–10459.
 40. Grande-Pérez, A., E. Lazaro, P. Lowenstein, E. Domingo, and S. C. Manrubia. 2005. Suppression of viral infectivity through lethal defection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102:4448–4452.
 41. Grande-Pérez, A., S. Sierra, M. G. Castro, E. Domingo, and P. R. Lowenstein. 2002. Molecular indetermination in the transition to error catastrophe: systematic elimination of lymphocytic choriomeningitis virus through mutagenesis does not correlate linearly with large increases in mutant spectrum complexity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99:12938–12943.
 42. Iranzo, J., and S. C. Manrubia. 2009. Stochastic extinction of viral infectivity through the action of defectors. *Europhys. Lett.* 85:18001.
 43. Jahrling, P. B., et al. 1980. Lassa virus infection of rhesus monkeys: pathogenesis and treatment with ribavirin. *J. Infect. Dis.* 141:580–589.
 44. Jahrling, P. B., C. J. Peters, and E. L. Stephen. 1984. Enhanced treatment of Lassa fever by immune plasma combined with ribavirin in cynomolgus monkeys. *J. Infect. Dis.* 149:420–427.
 45. Jamieson, D. J., A. P. Kourtis, M. Bell, and S. A. Rasmussen. 2006. Lymphocytic choriomeningitis virus: an emerging obstetric pathogen? *Am. J. Obstet. Gynecol.* 194:1532–1536.
 46. Johnson, J. A., et al. 2008. Minority HIV-1 drug resistance mutations are present in antiretroviral treatment-naïve populations and associate with reduced treatment efficacy. *PLoS Med.* 5:e158.
 47. Jordan, I., T. Briese, N. Fischer, J. Y. Lau, and W. I. Lipkin. 2000. Ribavirin inhibits West Nile virus replication and cytopathic effect in neural cells. *J. Infect. Dis.* 182:1214–1217.
 48. Kanda, T., et al. 2004. Inhibition of subgenomic hepatitis C virus RNA in Huh-7 cells: ribavirin induces mutagenesis in HCV RNA. *J. Viral. Hepat.* 11:479–487.
 49. Kenyon, R. H., P. G. Canonico, D. E. Green, and C. J. Peters. 1986. Effect of ribavirin and tributylribavirin on Argentine hemorrhagic fever (Junin virus) in guinea pigs. *Antimicrob. Agents Chemother.* 29:521–523.
 50. Kerr, S. J. 1987. Ribavirin induced differentiation of murine erythroleukemia cells. *Mol. Cell. Biochem.* 77:187–194.
 51. Kilgore, P. E., et al. 1997. Treatment of Bolivian hemorrhagic fever with intravenous ribavirin. *Clin. Infect. Dis.* 24:718–722.
 52. Kuntzen, T., et al. 2008. Naturally occurring dominant resistance mutations to hepatitis C virus protease and polymerase inhibitors in treatment-naïve patients. *Hepatology* 48:1769–1778.
 53. Kunz, B. A., et al. 1994. International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens. Deoxyribonucleoside triphosphate levels: a critical factor in the maintenance of genetic stability. *Mutat. Res.* 318:1–64.
 54. Lanford, R. E., et al. 2001. Ribavirin induces error-prone replication of GB virus B in primary tamarin hepatocytes. *J. Virol.* 75:8074–8081.
 55. Lee, A. M., et al. 2008. Inhibition of cellular entry of lymphocytic choriomeningitis virus by amphipathic DNA polymers. *Virology* 372:107–117.
 56. Le Moing, V., et al. 2002. Predictors of virological rebound in HIV-1-infected patients initiating a protease inhibitor-containing regimen. *AIDS* 16:21–29.
 57. Leysen, P., J. Balzarini, E. De Clercq, and J. Neyts. 2005. The predominant mechanism by which ribavirin exerts its antiviral activity in vitro against flaviviruses and paramyxoviruses is mediated by inhibition of IMP dehydrogenase. *J. Virol.* 79:1943–1947.
 58. Leysen, P., E. De Clercq, and J. Neyts. 2008. Molecular strategies to inhibit the replication of RNA viruses. *Antiviral Res.* 78:9–25.
 59. Leysen, P., E. De Clercq, and J. Neyts. 2006. The anti-yellow fever virus activity of ribavirin is independent of error-prone replication. *Mol. Pharmacol.* 69:1461–1467.
 60. Lucia, H. L., D. H. Coppenhaver, and S. Baron. 1989. Arenavirus infection in the guinea pig model: antiviral therapy with recombinant interferon-alpha, the immunomodulator CL246,738 and ribavirin. *Antiviral Res.* 12:279–292.
 61. Lutchman, G., et al. 2007. Mutation rate of the hepatitis C virus NS5B in patients undergoing treatment with ribavirin monotherapy. *Gastroenterology* 132:1757–1766.
 62. Maag, D., C. Castro, Z. Hong, and C. E. Cameron. 2001. Hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase (NS5B) as a mediator of the antiviral activity of ribavirin. *J. Biol. Chem.* 276:46094–46098.
 63. Martin, V., D. Abia, E. Domingo, and A. Grande-Pérez. 2010. An interfering activity against lymphocytic choriomeningitis virus replication associated with enhanced mutagenesis. *J. Gen. Virol.* 91:990–1003.
 64. Martin, V., A. Grande-Pérez, and E. Domingo. 2008. No evidence of selection for mutational robustness during lethal mutagenesis of lymphocytic choriomeningitis virus. *Virology* 378:185–192.
 65. Martínez, M. A., J. P. Vartanian, and S. Wain-Hobson. 1994. Hypermutagenesis of RNA using human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase and biased dNTP concentrations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91:11787–11791.
 66. McCormick, J. B., et al. 1986. Lassa fever. Effective therapy with ribavirin. *N. Engl. J. Med.* 314:20–26.
 67. McHutchison, J. G., et al. 1998. Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. Hepatitis Interventional Therapy Group. *N. Engl. J. Med.* 339:1485–1492.
 68. Mendenhall, M., et al. 2011. T-705 (favipiravir) inhibition of arenavirus replication in cell culture. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55:782–787.
 69. Moriyama, K., et al. 2008. Effects of introduction of hydrophobic group on ribavirin base on mutation induction and anti-RNA viral activity. *J. Med. Chem.* 51:159–166.
 70. Müller, V., and S. Bonhoeffer. 2008. Intra-host dynamics and evolution of HIV infections, p. 279–302. In E. Domingo, C. R. Parrish, and J. J. Holland (ed.), *Origin and evolution of viruses*, 2nd ed. Academic Press, London, United Kingdom.
 71. Nijhuis, M., N. M. van Maarseveen, and C. A. Boucher. 2009. Antiviral resistance and impact on viral replication capacity: evolution of viruses under antiviral pressure occurs in three phases. *Handb. Exp. Pharmacol.* 189:299–320.
 72. Oldstone, M. B. A. (ed.). 2002. Current topics in microbiology and immunology, vol. 262. Arenaviruses I. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
 - 72a. Oldstone, M. B. A. (ed.). 2002. Current topics in microbiology and immunology, vol. 263. Arenaviruses II. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
 73. Palacios, G., et al. 2008. A new arenavirus in a cluster of fatal transplant-associated diseases. *N. Engl. J. Med.* 358:991–998.
 74. Pariente, N., A. Airaksinen, and E. Domingo. 2003. Mutagenesis versus inhibition in the efficiency of extinction of foot-and-mouth disease virus. *J. Virol.* 77:7131–7138.
 75. Parker, W. B. 2005. Metabolism and antiviral activity of ribavirin. *Virus Res.* 107:165–171.
 76. Perales, C., R. Agudo, S. C. Manrubia, and E. Domingo. 2011. Influence of mutagenesis and viral load in sustained, low-level replication of an RNA virus. *J. Mol. Biol.* 407:60–78.
 77. Perales, C., R. Agudo, H. Tejero, S. C. Manrubia, and E. Domingo. 2009. Potential benefits of sequential inhibitor-mutagen treatments of RNA virus infections. *PLoS Pathog.* 5:e1000658.
 78. Perelson, A. S., and T. J. Layden. 2007. Ribavirin: is it a mutagen for hepatitis C virus? *Gastroenterology* 132:2050–2052.
 79. Pfeiffer, J. K., and K. Kirkegaard. 2005. Ribavirin resistance in hepatitis C virus replicon-containing cell lines conferred by changes in the cell line or mutations in the replicon RNA. *J. Virol.* 79:2346–2355.
 80. Popescu, M., H. Schaefer, and F. Lehmann-Grube. 1976. Homologous interference of lymphocytic choriomeningitis virus: detection and measurement of interference focus-forming units. *J. Virol.* 20:1–8.
 81. Ruiz-Jarabo, C. M., C. Ly, E. Domingo, and J. C. de la Torre. 2003. Lethal mutagenesis of the prototypic arenavirus lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV). *Virology* 308:37–47.
 82. Sánchez, G., A. Bosch, G. Gómez-Mariano, E. Domingo, and R. Pinto. 2003. Evidence for quasispecies distributions in the human hepatitis A virus genome. *Virology* 315:34–42.
 83. Schmitz, H., et al. 2002. Monitoring of clinical and laboratory data in two cases of imported Lassa fever. *Microbes Infect.* 4:43–50.
 84. Severson, W. E., C. S. Schmaljohn, A. Javadian, and C. B. Jonsson. 2003. Ribavirin causes error catastrophe during Hantaan virus replication. *J. Virol.* 77:481–488.
 85. Sevilla, N., and J. C. de la Torre. 2006. Arenavirus diversity and evolution: quasispecies in vivo. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 299:315–335.
 86. Sidwell, O. W., L. N. Simon, J. T. Witkowski, and R. K. Robins. 1974.

- Antiviral activity of virazole: review and structure-activity relationships. *Prog. Chemother.* **2**:889–903.
87. **Sierra, M., et al.** 2007. Foot-and-mouth disease virus mutant with decreased sensitivity to ribavirin: implications for error catastrophe. *J. Virol.* **81**:2012–2024.
 88. **Smee, D. F., et al.** 1993. Treatment of lethal Pichinde virus infections in weanling LVG/Lak hamsters with ribavirin, ribamidine, selenazofurin, and amipigen. *Antiviral Res.* **20**:57–70.
 89. **Smith, R. A., and W. Kirkpatrick.** 1980. Ribavirin: a broad spectrum antiviral agent. Academic Press, Inc., New York, NY.
 90. **Snell, N. J.** 2001. Ribavirin—current status of a broad spectrum antiviral agent. *Expert Opin. Pharmacother.* **2**:1317–1324.
 91. **Streeter, D. G., et al.** 1973. Mechanism of action of 1- β -D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide (Virazole), a new broad-spectrum antiviral agent. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **70**:1174–1178.
 92. **Tapia, N., et al.** 2005. Combination of a mutagenic agent with a reverse transcriptase inhibitor results in systematic inhibition of HIV-1 infection. *Virology* **338**:1–8.
 93. **Van Vaerenbergh, K., et al.** 2002. Initiation of HAART in drug-naïve HIV type 1 patients prevents viral breakthrough for a median period of 35.5 months in 60% of the patients. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **18**:419–426.
 94. **Volkenstein, M. V.** 1994. Physical approaches to biological evolution. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
 95. **Welsh, R. M., et al.** 1975. A comparison of biochemical and biological properties of standard and defective lymphocytic choriomeningitis virus. *Bull. World Health Organ.* **52**:403–408.
 96. **Welsh, R. M., C. M. O'Connell, and C. J. Pfau.** 1972. Properties of defective lymphocytic choriomeningitis virus. *J. Gen. Virol.* **17**:355–359.
 97. **Zhou, S., R. Liu, B. M. Baroudy, B. A. Malcolm, and G. R. Reyes.** 2003. The effect of ribavirin and IMPDH inhibitors on hepatitis C virus subgenomic replicon RNA. *Virology* **310**:333–342.
 98. **Zimmerman, T. P., and R. D. Deepprose.** 1978. Metabolism of 5-amino-1- β -D-ribofuranosylimidazole-4-carboxamide and related five-membered heterocycles to 5'-triphosphates in human blood and L5178Y cells. *Biochem. Pharmacol.* **27**:709–716.

Mutagenesis-Mediated Virus Extinction: Virus-Dependent Effect of Viral Load on Sensitivity to Lethal Defection

Héctor Moreno¹, Héctor Tejero^{1,2}, Juan Carlos de la Torre³, Esteban Domingo^{1,4*}, Verónica Martín^{1,5}

1 Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa" (CSIC-UAM), Cantoblanco, Madrid, Spain, **2** Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular I. Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain, **3** Department of Neuropharmacology, The Scripps Research Institute, La Jolla, California, United States of America, **4** Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd), Barcelona, Spain, **5** Centro de Investigación en Sanidad Animal (CISA-INIA) Instituto Nacional de Investigación Agraria y Alimentaria, Valdeolmos, Madrid, Spain

Abstract

Background: Lethal mutagenesis is a transition towards virus extinction mediated by enhanced mutation rates during viral genome replication, and it is currently under investigation as a potential new antiviral strategy. Viral load and virus fitness are known to influence virus extinction. Here we examine the effect or the multiplicity of infection (MOI) on progeny production of several RNA viruses under enhanced mutagenesis.

Results: The effect of the mutagenic base analogue 5-fluorouracil (FU) on the replication of the arenavirus lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) can result either in inhibition of progeny production and virus extinction in infections carried out at low multiplicity of infection (MOI), or in a moderate titer decrease without extinction at high MOI. The effect of the MOI is similar for LCMV and vesicular stomatitis virus (VSV), but minimal or absent for the picornaviruses foot-and-mouth disease virus (FMDV) and encephalomyocarditis virus (EMCV). The increase in mutation frequency and Shannon entropy (mutant spectrum complexity) as a result of virus passage in the presence of FU was more accentuated at low MOI for LCMV and VSV, and at high MOI for FMDV and EMCV. We present an extension of the lethal defection model that agrees with the experimental results.

Conclusions: (i) Low infecting load favoured the extinction of negative strand viruses, LCMV or VSV, with an increase of mutant spectrum complexity. (ii) This behaviour is not observed in RNA positive strand viruses, FMDV or EMCV. (iii) The accumulation of defection genomes may underlie the MOI-dependent behaviour. (iv) LCMV coinfections are allowed but superinfection is strongly restricted in BHK-21 cells. (v) The dissimilar effects of the MOI on the efficiency of mutagenic-based extinction of different RNA viruses can have implications for the design of antiviral protocols based on lethal mutagenesis, presently under development.

Citation: Moreno H, Tejero H, de la Torre JC, Domingo E, Martín V (2012) Mutagenesis-Mediated Virus Extinction: Virus-Dependent Effect of Viral Load on Sensitivity to Lethal Defection. PLoS ONE 7(3): e32550. doi:10.1371/journal.pone.0032550

Editor: Jean-Pierre Vartanian, Institut Pasteur, France

Received: November 17, 2011; **Accepted:** February 1, 2012; **Published:** March 19, 2012

Copyright: © 2012 Moreno et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: Work at Centro de Biología Molecular Severo Ochoa is supported by grants BFU2008-02816/BMC from Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN) and Fundación Ramon Areces. CIBERehd (Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas) is funded by Instituto de Salud Carlos III. HM is supported by FI08/00775 from Instituto de Salud Carlos III. HT is supported by AP2006-01044, from MEC (Spain) and Grant no. BFU2009-12895-C02-02 from MEC (Spain). VM is supported by a contract RYC-2010-06516 from MICINN (Spain). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: edomingo@cbm.uam.es

Introduction

RNA viruses display high mutation rates and frequencies that lead to the generation of dynamic mutant spectra termed viral quasispecies [1–8]. Quasispecies dynamics represents a serious impairment for the efficacy of antiviral treatments because of the rapid selection of viral mutants resistant to one or several antiviral agents. This problem has encouraged the search for alternative approaches to control viral infections. A new antiviral strategy termed lethal mutagenesis aims at increasing the viral mutation rate beyond a biologically tolerable threshold, resulting in reduced viral fitness and, eventually, virus extinction [9–14]. Arenaviruses are attractive pathogens to investigate lethal mutagenesis because of the very limited number of effective antiviral inhibitors available, and the impact of arenavirus diseases for human health [15–18].

Lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV), the prototype arenavirus, is an enveloped virus with a bi-segmented negative strand RNA genome. Each genome segment uses an ambisense coding strategy to direct the synthesis of two viral polypeptides in opposite directions and separated by a non-coding intergenic region (IGR) [19,20]. The L segment encodes the Z protein, a small RING protein that has matrix-like functions including budding activity and regulation of RNA synthesis [21,22], and the RNA-dependent RNA polymerase or L protein [23–26]. The S segment encodes the glycoprotein precursor (GP-C) and the nucleoprotein (NP) [17]. Mutation frequencies within mutant spectra of molecular clones of LCMV replicated in BHK-21 cells are in the range of 1.0×10^{-4} to 2.7×10^{-4} substitutions per nucleotide [27], values which are comparable to those quantitated for other RNA viruses [28,29].

In cell culture, the pyrimidine analogue 5-fluorouracil (FU) is mutagenic for LCMV, as evidenced by increases of the average mutation frequency of mutant spectra, which is associated with a decreased specific infectivity (PFUs per LCMV RNA molecule) [27,30–34]. FU mutagenesis led to LCMV extinction both, during serial passages of the virus in BHK-21 cells, and upon extended, persistent infection in BHK-21 cells (infected cells maintained for a maximum of 100 h; no virus passage is involved [33,30]). In both cases extinction occurred without any modification of the consensus nucleotide sequence of the population [31,30,27,33,32,34]. LCMV decreased its intracellular and extracellular infectivity to a larger extent than the viral RNA levels [30]. This result, together with *in silico* simulations of the LCMV population dynamics, led to the formulation of the lethal defection model of virus extinction. This model proposes the participation of a class of altered RNA genomes termed defectors in the loss of infectivity [33,30]. Defectors are RNA replication-competent genomes that encode altered versions of viral proteins that interfere with replication of the standard virus [30,35,36]. It must be underlined that, as defined, defectors differ from standard defective-interfering (DI) particles in that DI RNAs are dependent on standard virus for completion of their infectious cycle [37], whereas defectors may not depend on the standard virus.

DIs can be viewed as standard virus-dependent defectors. DIs of LCMV are rapidly generated during replication, and underlie homologous interference (also termed autointerference) in standard virus production [38–43]. In the description of our results we refer to defectors to mean any type of genome (dependent or not on the standard virus for replication) that has the potential to interfere with replication of the standard virus. The lethal defection model is congruent with data that indicate that interactions within mutant spectra may influence adaptation or de-adaptation of genome subpopulations [44–46,36,35,47–49].

Studies with the picornavirus foot-and-mouth disease virus (FMDV) showed that low viral load and low fitness favored mutagen-induced virus extinction [50,51]. In the present report, we have examined the effect of the initial viral dose on LCMV extinction, and found that following infection at low MOI, FU inhibited production of infectious progeny of LCMV, as well as of the rhabdovirus vesicular stomatitis virus (VSV), to a much larger extent than FMDV or encephalomyocarditis virus (EMCV). We propose that this different behaviour might relate to a favored generation of defector genomes during LCMV or VSV replication, as compared to the picornaviruses FMDV or EMCV. This interpretation is reinforced by the observation that passaged EMCV acquires an enhanced FU inhibition at low MOI. Given the increasingly recognized influence of the entire mutant spectrum in virus behavior [7], we present an extended lethal defection model that considers the effect that intracellular interactions among standard, mutant, and defector viruses can have on the extracellular virus dynamics. The model provides good support to the experimental results. Implications for antiviral therapy of the disparate effects of the initial viral load on the response of viruses to mutagenesis are discussed.

Results

Effect of 5-fluorouracil and the multiplicity of infection on lymphocytic choriomeningitis virus progeny production

Infections of BHK-21 cells with LCMV ARM 53b at MOIs of 0.001, 0.01, 0.1, 1, 3 and 10 PFU/cell, in the absence or presence of FU (20, 35, and 50 µg/ml), documented a dose-dependent inhibitory effect of FU at all MOIs tested, a decrease of progeny production as a function of the MOI in the passages in the absence

of FU, and a decrease of inhibition by FU as a function of the MOI (Figure 1A). A general linear model analysis of the logarithm of the progeny production as a function of the logarithm of MOI and the inhibition by FU shows a significant interaction between the MOI and the inhibition by FU ($p < 0.05$). Post Hoc multiple pairwise comparisons were carried out to compare the inhibition exerted by FU at the lowest MOI with that exerted at each of the other MOI for all the FU concentrations tested ($p < 0.05$; pairwise t-test with Bonferroni Correction). This analysis revealed a significant decrease in the inhibition at the higher MOI for all the pairs tested. No significant differences were observed when comparing the differences in inhibition between MOI 3 PFU/cell and MOI 10 PFU/cell for all the concentrations of FU tested ($p > 0.05$; pairwise t-test with Bonferroni correction).

The negative correlation between the inhibition of LCMV production by FU and the MOI was observed when the virus titer was measured at 24 h and 48 h p.i., but not at 8 h p.i. (Figure 1B). Also, the decrease of infectious LCMV progeny production in the absence of FU when the MOI increased was observed at 48 h p.i. but not at 8 h or 24 h p.i. (Figure 1B). The effect of MOI on progeny production of LCMV RNA was less pronounced than the effect on infectivity, and the differences between RNA progeny at different MOIs did not reach statistical significance (Figs. 2B and 2C). Thus, both production of infectious LCMV progeny and the effect of FU on such a production depend on the MOI and the time p.i. at which the amount of progeny is determined.

Effect of 5-fluorouracil and the multiplicity of infection on the replication of other RNA viruses

To investigate whether the decreased inhibition of LCMV infectious progeny production by FU at high MOI could be a more general phenomenon relevant also to other RNA viruses, we carried out experiments with VSV, FMDV and EMCV (Figure 2). The range of FU concentrations used in the experiments with FMDV and EMCV was increased relative to the concentration used with LCMV or VSV because of the lower sensitivity of these picornaviruses to the inhibitory activity of FU [50,52,53]. As with LCMV, the inhibition of VSV progeny production by FU decreased with the MOI (Figure 2A). A general linear model analysis evidenced a significant interaction between the logarithm of the MOI of VSV and the inhibition by FU ($p < 0.005$). Post Hoc multiple pairwise comparisons showed that the difference in the inhibition, relative to the inhibition at MOI of 0.001 PFU/cell, was always statistically significant for all MOI and FU concentrations tested ($p < 0.05$; pairwise t-test with Bonferroni Correction). As in the case of LCMV, no significant differences in inhibition were observed when comparing the inhibitions at MOI 1 PFU/cell and MOI 10 PFU/cell for all FU concentrations tested ($p > 0.05$; pairwise t-test with Bonferroni correction).

In contrast to LCMV and VSV, FMDV and EMCV did not display any global trend towards decreased inhibition by FU as a function of the logarithm of the MOI over the range of MOI tested ($p = 0.325$ and $p = 0.517$, respectively; General Linear Model) (Fig. 3B and 3C). However, for FMDV a significant difference between the inhibition exerted by FU in the infections at MOI of 10 and MOI 0.001 PFU/cell was observed; for EMCV the difference was significant when comparing the MOI of 1 PFU/cell with 0.001 PFU/cell ($p < 0.05$ in both cases; pairwise t-test with Bonferroni correction; Fig. 3B and 3C). Thus, a negative correlation between the inhibition of viral progeny production by FU and the MOI is not a general occurrence for RNA viruses, since it is clearly detected for LCMV and VSV, but not for FMDV and EMCV (Figs. 2 and 3).

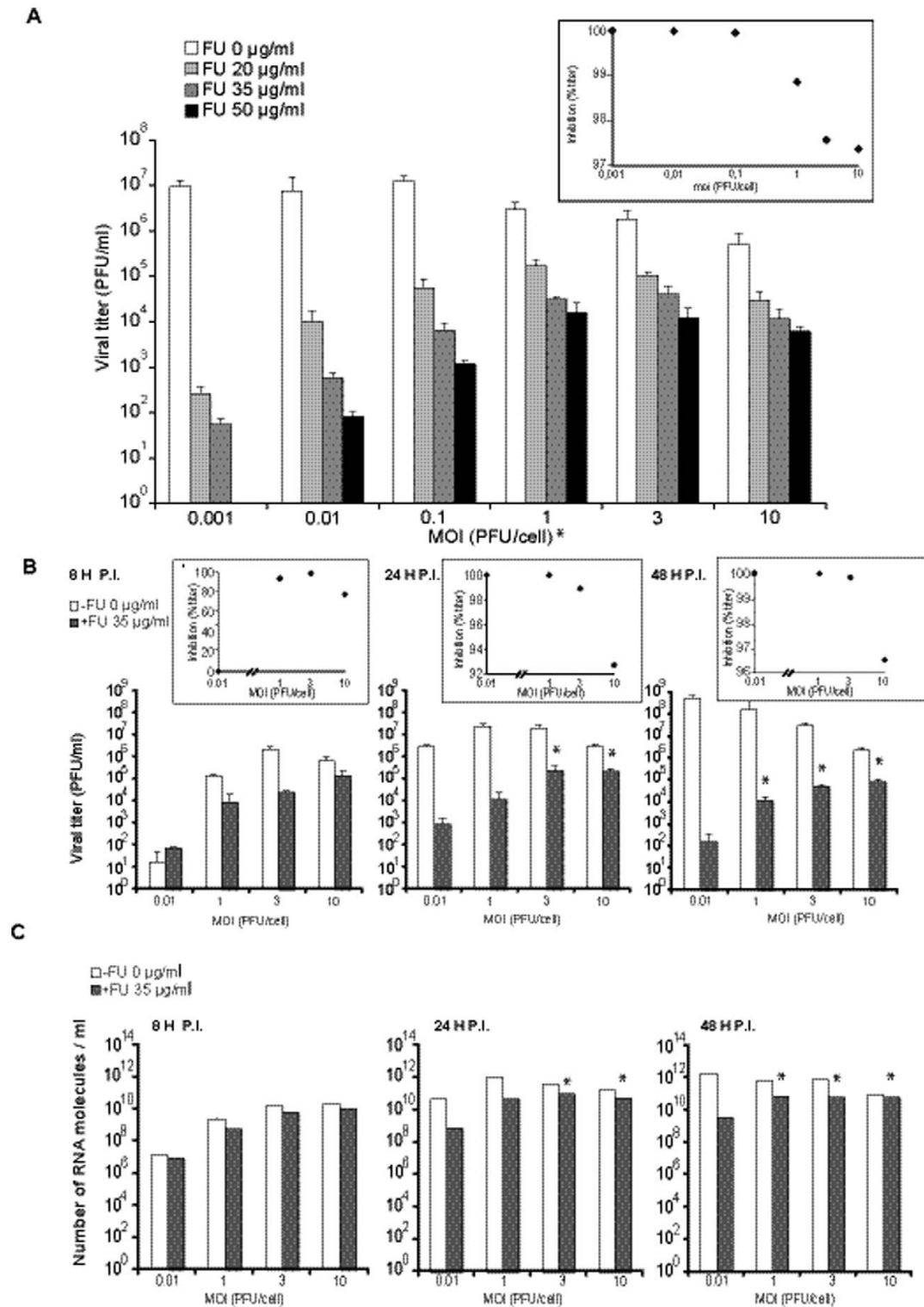


Figure 1. Effect of the multiplicity of infection (MOI) on the inhibition of LCMV production by 5-fluorouracil (FU). BHK-21 cells were infected with LCMV ARM 53b at the indicated MOI in the absence (white bars) or presence of different concentrations of FU (increasingly dark bars), as indicated in each panel. The asterisks above the bars indicate those inhibitions that are significantly different from those obtained in the infection at a MOI of 0.001 PFU/cell. A. Cell culture supernatants were harvested at 48 h p.i. and titrated. Viral titers are the average of at least four determinations and standard deviations are given. All pairwise comparisons with the inhibition at MOI 0.001 PFU/cell were significantly different. The inset visualizes the variation of the percentage of inhibition by 35 μ g/ml FU as a function of the MOI. B. Similar to A, but with values for supernatants harvested at 8, 24 and 48 h p.i. Insets are as in panel A. C. Number of molecules of L genomic viral RNA in the cell culture supernatants harvested at 8, 24 and 48 h p.i. (same samples as those analyzed in B). RNA measures are the average of three determinations and standard deviations are given (low and not visible). Procedures are described in Materials and Methods.
doi:10.1371/journal.pone.0032550.g001

Genetic analysis of the 5-fluorouracil-treated viral populations obtained at different multiplicities of infection

Extended viral replication often results in an increase of the complexity of mutant spectra of viral populations [4,7]. To investigate whether the amount of progeny virus correlated with genetic heterogeneity, we determined the complexity of the mutant spectra of LCMV populations, as well as values of progeny infectivity and progeny RNA and specific infectivity at 48 h p.i., following infection in the absence or presence of FU, at a MOI 0.01 PFU/cell and 10 PFU/cell (Table 1). The specific infectivity of progeny virus was about 10-fold lower in infections carried out at high MOI relative to low MOI, in the absence of FU. In contrast, the specific infectivity was about 30-fold higher at high MOI in the presence of FU. For all comparisons, the mutation frequency was significantly higher in the presence of FU than in its absence ($p < 0.05$; χ^2 test), as expected from the mutagenic activity of FU on LCMV [30,31,27,32–34]. Interestingly, the mutation frequency of populations passaged in the presence of FU was 1.8- to 2.4-fold higher at a MOI of 0.01 PFU/cell than at a MOI of 10 PFU/cell, a difference that was statistically significant ($p = 0.047$; χ^2 test). The increase of Shannon entropy in the populations passaged in the presence of FU was at least 1.6- to 6.4-fold higher at low MOI than at high MOI, mirroring the effect of the MOI on the mutation frequency (Table 1). In all cases, a decrease in specific infectivity was accompanied by an increase of mutant spectrum complexity (compare columns 5, 6 and 7 in Table 1).

Unexpectedly, the bias in mutation types associated with FU mutagenesis differed between the L- and Z-genomic regions analyzed. A→G transitions were the most frequent mutation types in L, while U→C transitions were the most frequent types in Z (Table 1), and the difference was statistically significant ($p < 0.001$; χ^2 test). This genome segment-dependent mutational bias is under investigation.

The variation of mutant spectrum complexity as a result of FU mutagenesis in the course of infections with VSV, FMDV and EMCV at different MOIs showed dissimilar patterns. VSV displayed a behaviour similar to LCMV, but none of the differences reached statistical significance (Table 2). Under the conditions of MOI in which LCMV and VSV manifested a higher sensitivity to FU inhibition, its corresponding mutant spectrum displayed a higher complexity. The predominant mutation types induced by FU in VSV were A→G transitions. FMDV and EMCV showed the opposite trend than LCMV or VSV regarding the effect of FU or the MOI on mutant spectrum complexity, but none of the differences reached statistical significance (Table 2). Thus, these two picornaviruses deviate from the behaviour of LCMV regarding the effect of FU and the MOI on mutant spectrum complexity.

An extended lethal defection model

For a better understanding of the viral dynamics involved in lethal mutagenesis of LCMV, and to help in the interpretation of the experimental results, an extension of the lethal defection model

[30,54,46,35] has been developed. The extracellular virus dynamics follows the basic model of viral dynamics [55]. It is assumed that the cell can be in three different states: susceptible (*S*), exposed (*E*), and infected (*I*) (Figure 3A). One virus particle can infect an *S* cell, which becomes an *E* cell. The maximum number of particles that can enter a cell is determined by the parameter $maxVirusCell$ (see Table S1 for a list of parameters and their numerical values). Thus, the model takes into account different degrees of cell coinfection. Viruses are assumed to have the same internalization rate, β , for *S* and *E* cells due to an excess of receptor molecules on the cell surface [56]. Cells are in the *E* state during early times after virus penetration, prior to becoming *I* cells with a rate constant k_e . New virus particles can enter *E* cells but not *I* cells. *I* cells release *b* infectious progeny with a rate constant k_i . Since LCMV induces a persistent, non-cytolytic infection, the cell population (confluent monolayer) is taken as constant during the simulation, i.e. no cell death or cell growth are considered. Viruses are degraded according to a constant rate u (Figure 3A). Modeling of the intracellular dynamics has been based on our current understanding of the basic steps of arenavirus multiplication (Figure 3B). Three kinds of virus have been considered: (i) viable viruses that can complete an infectious cycle and produce infectious progeny by themselves; (ii) DI particles that cannot multiply in the absence of a viable virus, but that have a replicative advantage over the viable viruses when both coexist in the same cell [37,57–59]. (iii) Defector viruses that are RNA replication-competent and can interfere with replication or production of the standard virus [30].

For simplicity, viral genomes are represented by four “functional genosets”. A functional genoset includes the genomic positions involved in a given viral function, irrespective of their location in the viral genome (Figure 3B). A given nucleotide can belong to more than one genoset but, as a first approach, this fact is not taken into account in this model. The effect of a genoset in a given viral function is expressed by a numerical value that depends on the number of mutations (relative to a given reference sequence) at any position within the genoset. Therefore, a viral genome is represented by a vector whose components are the mutations at each genoset.

Genoset *S* includes the residues that encode the exclusively *cis-acting* viral functions needed for the genome to be replicated. Genoset *R* involves the genome positions that participate in any viral function (needed for genome replication) that acts both in *cis* and *trans*. Genoset *P* includes the nucleotide positions involved in the production and release of viral particles. Genoset *D* encompasses any residue involved in the generation of DI particles. When the *D* genoset has zero mutations the genome is viable, and when the *D* genoset has at least one mutation the genome is a DI. Genosets *R* and *P* serve also to define two classes of defector genomes: the *R* genoset-associated defectors are those that can be replicated but do not contribute to the viral functions needed for genome replication; the *P* genoset-associated defectors are those that can be encapsidated but do not contribute to the production and release of viral particles. The mathematical

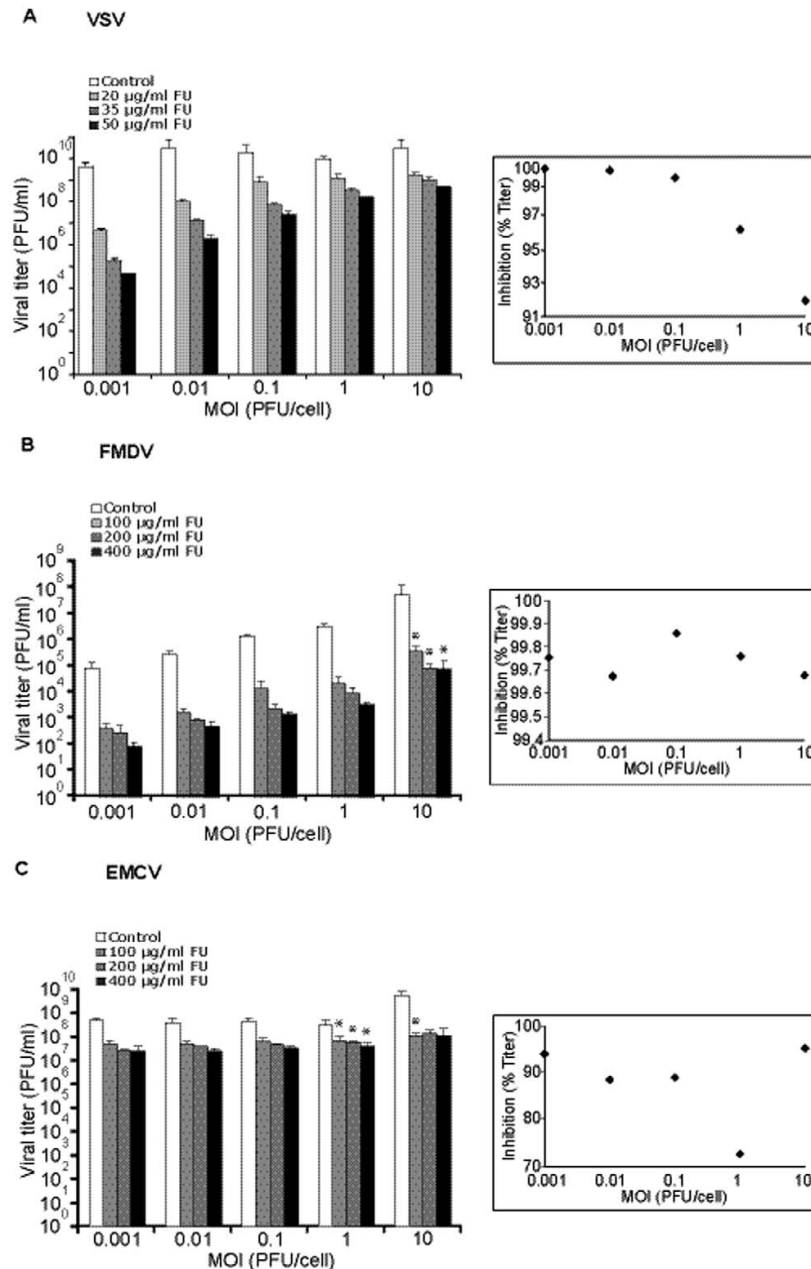


Figure 2. Effect of the multiplicity of infection (MOI) on the inhibition of vesicular stomatitis virus (VSV), foot-and-mouth disease virus (FMDV), and encephalomyocarditis virus (EMCV) by 5-fluorouracil (FU). BHK-21 cells were infected with VSV (A), FMDV (B) or EMCV (C) at the indicated MOI in the absence (white bars) or presence (increasingly dark bars) of different concentrations of FU, as indicated in each panel. Cell culture supernatants were harvested at 24 h p.i. and titrated as described in Materials and Methods. Viral titers are the average of at least four determinations and standard deviations are given. The asterisks above the bars indicate those inhibitions that are significantly different from those obtained in the infection at a MOI of 0.001 PFU/cell. No asterisks were added for VSV because all the pairwise comparisons with the inhibition at MOI 0.001 PFU/cell were significantly different. The panels on the right visualize the variation of the percentage of inhibition (by 35 µg/ml FU for VSV, 200 µg/ml FU for FMDV and EMCV) as a function of the MOI.
doi:10.1371/journal.pone.0032550.g002

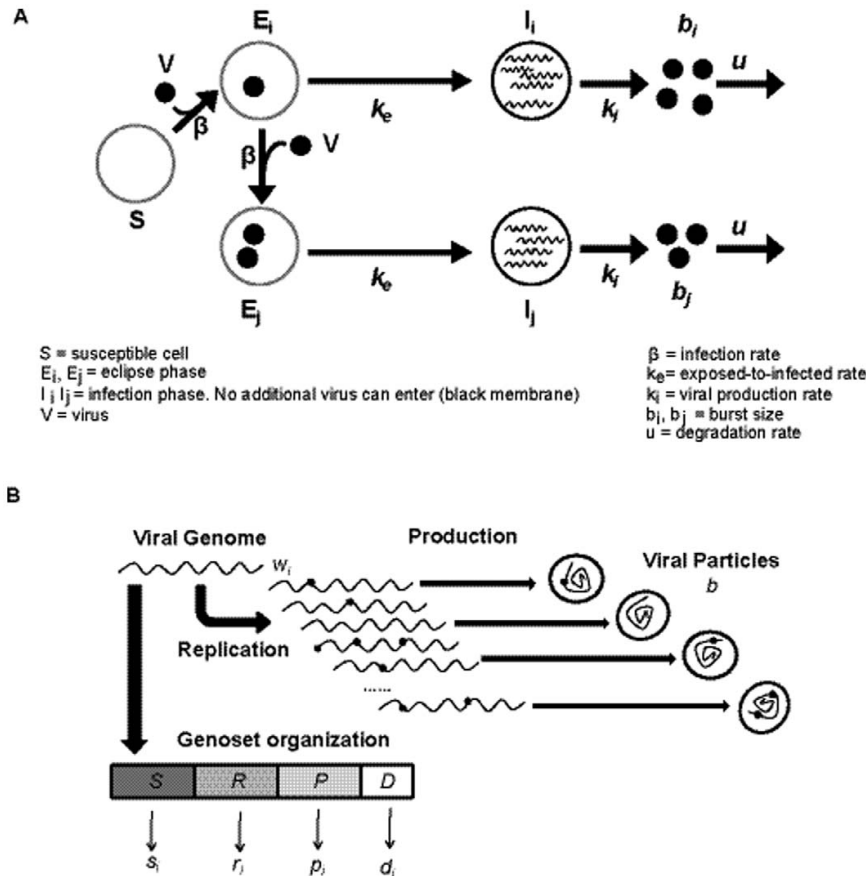


Figure 3. Basic features of the genosets model of lethal defection. A. Scheme of the infection of susceptible cells (S) by LCMV (V), stages of the infection process, and main parameters involved in the model (further detailed in the text and in Text S1). B. Scheme of the intracellular dynamics (excluding transcription) with formation of mutant genomes (dots on wavy lines) that may or may not be encapsidated. The boxes depict the genoset organization, which does not fit the physical map of the LCMV genome (see text), and which forms the conceptual basis of the extended lethal defection model presented here.
doi:10.1371/journal.pone.0032550.g003

functions relating the mutations in a given genoset, and their associated numerical functions are given in the Text S1.

Based on the four genosets, equations for the replication rate and burst size have been formulated. The model considers a single replication cycle. Replication of genome i produces a number of RNA copies (w_i) per round of replication, which is given by the nearest integer number to $w_i = w_0 \cdot s_i \cdot (cisR \cdot r_i + transR \cdot \bar{r}) \cdot (d_i)$, where w_0 is the number of genomes produced by the standard LCMV genome, s_i and r_i are the numerical values associated to the S and R genosets, respectively, and $cisR$ and $transR$ are two parameters that permit assigning more weight to either cis or $trans$ interactions in the functions associated with the R genoset; $cisR$ and $transR$ must fulfill the condition that $cisR + transR = 1$. The intracellular interactions among different viral genomes is introduced by means of the average replicative ability of the viral population, $\bar{r} = \sum r_i$, which is the average of the numerical values associated with all the R genosets of the genomes present in the same cell. $RepAdv$ is a parameter that expresses the replicative advantage of DIs relative to standard and defector viruses. Thus,

the replication ability w_i of a genome depends on the intracellular viral genome population as a whole. During genome replication, each genoset mutates according to a Poisson distribution whose mean is the mutation rate per genoset (U_S , U_R , U_P , and U_D). The mutation rates per genoset are the product of the mutation rate per site, m , and the genoset length (see Text S1 and Table S1). A mutation rate per genome, U , is defined as the sum of the mutation rates per genoset.

Each cell can produce a maximum number of viral particles per unit time ($maxBsize$), which depends on the metabolic and physiological state of the cell. The total number of virus particles, infectious or not, b , produced by a cell, is given by $b = \min(maxBsize, Ngen) \cdot \bar{p}$, where $\min(maxBsize, Ngen)$ equals $maxBsize$ when $Ngen$ (which is the number of genomes inside the cell) is larger than $maxBsize$; $\min(maxBsize, Ngen)$ equals $Ngen$ when the latter is lower than $maxBsize$. To obtain the number of virus released from the cell, $\min(maxBsize, Ngen)$ is multiplied by the average efficacy of viral production in a cell, given by $\bar{p} = \sum p_i$ (a term equivalent to the average numerical values for all the P

Table 1. Quasispecies analysis of FU-treated LCMV populations.

5-Fluorouracil concentration (µg/ml) ^a	Gene analyzed ^b	MOI (PFU/cell) ^a	Progeny infectivity (PFU/ml) ^c	Progeny RNA (molec/ml) ^d	Specific infectivity (PFU/RNA molec) ^e	Mutation frequency (sn/nt) ^f	Shannon Entropy ^g	Sequenced nucleotides (nts)	Mutations Types				Transversions ^h	
									A→G	G→A	C→U	U→C	C→A	A→C
0	L	0.01	(5.6±1.7)×10 ⁸	(2.0±0.01)×10 ¹²	2.7×10 ⁻⁴	1.8×10 ⁻⁴	0.13	16,800	0	1	1	1	0	0
0	L	10	(2.5±0.6)×10 ⁵	(1.0±0.01)×10 ¹¹	2.3×10 ⁻⁵	3.8×10 ⁻⁴	0.27	15,680	4	0	0	0	0	1
0	Z	0.01	(5.6±1.7)×10 ⁸	(2.0±0.01)×10 ¹²	2.7×10 ⁻⁴	<1.2×10 ⁻⁴	0	7,800	0	0	0	0	0	0
0	Z	10	(2.5±0.6)×10 ⁵	(1.0±0.01)×10 ¹¹	2.3×10 ⁻⁵	2.5×10 ⁻⁴	0.10	7,800	0	0	0	0	1	1
35	L	0.01	(1.7±2.1)×10 ²	(3.7±0.01)×10 ⁹	4.5×10 ⁻⁸	2.2×10 ⁻³	0.83	16,144	28	0	0	5	0	0
35	L	10	(8.7±2.5)×10 ⁴	(6.6±0.01)×10 ¹⁰	1.3×10 ⁻⁶	9.0×10 ⁻⁴	0.44	14,325	12	1	0	1	0	0
35	Z	0.01	(1.7±2.1)×10 ²	(3.7±0.01)×10 ⁹	4.5×10 ⁻⁸	1.8×10 ⁻³	0.46	7,800	2	1	0	11	0	0
35	Z	10	(8.7±2.5)×10 ⁴	(6.6±0.01)×10 ¹⁰	1.3×10 ⁻⁶	1.0×10 ⁻³	0.25	7,800	0	0	0	7	1	1

^aBHK-21 cell monolayers were infected at the indicated MOI in the absence or presence of 5-fluorouracil, as detailed in Materials and Methods.^bThe genomic regions sequenced were the entire Z-coding region and residues 3654 to 4260 of the L-coding region.^cTiter of LCMV progeny determined at 48 h p.i.^dQuantification by real time RT-PCR of LCMV RNA in progeny, extracellular virus at 48 h p.i. in molecules/ml.^eRatio of virus titer and number of viral RNA molecules per ml of cell culture supernatant determined at 48 h p.i.^fAverage number of mutations per nucleotide, counted relative to the corresponding consensus nucleotide sequence.^gProportion of different genomic sequences in the mutant spectrum of the quasispecies, calculated as described in Materials and Methods.^hThe omitted transversion types were not represented in the sequences analyzed.

doi:10.1371/journal.pone.0032550.t001

Table 2. Quasispecies analysis of FU-treated VSV, FMDV and EMCV populations.

5-Fluorouracil concentration (µg/ml) ^a	Virus analyzed ^b	MOI (PFU/cell) ^a	Progeny infectivity (PFU/ml) ^c	Mutation frequency (sn/nt) ^d	Shannon Entropy ^e	Sequenced nucleotides (nts)	Mutations Types							
							Transitions				Transversions ^f			
							A→G	G→A	C→U	U→C	C→A	A→C	U→G	G→C
0	VSV	0.01	(2.7±4.1)×10 ¹⁰	6.6×10 ⁻⁵	0.05	30,060	0	1	0	0	0	0	1	0
0	VSV	10	(2.6±4.1)×10 ¹⁰	6.2×10 ⁻⁵	0.05	32,064	1	0	0	1	0	0	0	0
0	FMDV	0.001	(8.5±4.8)×10 ⁴	1.3×10 ⁻⁴	0.10	23,715	1	0	0	2	0	0	0	1
0	FMDV	1	(3.3±0.9)×10 ⁶	3.9×10 ⁻⁵	0.02	25,296	1	0	0	0	0	0	0	0
0	EMCV	0.001	(4.5±1.4)×10 ⁸	1.9×10 ⁻⁴	0.15	30,720	2	0	2	2	0	0	0	0
0	EMCV	1	(2.8±2.0)×10 ⁸	3.4×10 ⁻⁵	0.02	29,440	0	1	0	0	0	0	0	0
35	VSV	0.01	(1.3±0.1)×10 ⁷	4.7×10 ⁻⁴	0.41	32,064	9	3	2	1	0	1	0	0
35	VSV	10	(9.9±3.9)×10 ⁸	2.5×10 ⁻⁴	0.21	31,396	5	1	1	1	0	0	0	0
200	FMDV	0.001	(2.7±2.7)×10 ²	1.9×10 ⁻⁴	0.13	25,296	2	1	2	0	0	0	0	0
200	FMDV	1	(9.2±6.2)×10 ³	4.5×10 ⁻⁴	0.29	22,134	1	0	1	7	0	0	0	1
200	EMCV	0.001	(2.5±0.2)×10 ⁷	1.9×10 ⁻⁴	0.15	30,720	1	0	3	1	1	0	0	0
200	EMCV	1	(5.4±0.8)×10 ⁷	2.3×10 ⁻⁴	0.18	30,080	1	1	1	3	0	0	0	0

^aBHK-21 cell monolayers were infected with VSV, FMDV or EMCV at the indicated MOI in the absence or presence of 5-fluorouracil, as detailed in Materials and Methods.^bThe genomic regions sequenced were nucleotides 5902 to 6569 of the L-coding region of VSV, 6800 to 7350 of the 3D (polymerase)-coding region of FMDV, and 6718 to 7403 of the 3D (polymerase)-coding region of EMCV.^cTiter of VSV, FMDV and EMCV progeny determined at 24 h p.i.^dAverage number of mutations per nucleotide counted relative to the corresponding consensus nucleotide sequence. The mutation frequency of VSV increased in the presence of FU, and was 1.9-fold higher at low than at high MOI, but the differences were not statistically significant ($p=0.33$; χ^2 test).^eProportion of different genomic sequences in the mutant spectrum of the quasispecies, calculated as described in Materials and Methods. Variations in Shannon entropy followed, the same trend as variations in mutation frequency but, again, the differences were not statistically significant (see footnote d).^fThe omitted transversion types were not represented in the sequences analyzed.

doi:10.1371/journal.pone.0032550.t002

genosets present in the cell under consideration). Then, b genomes are selected at random and released from the cell. When *trans* interactions are not allowed, \bar{p} is taken as 1, and genomes are encapsidated according to the value of their P genoset.

An initial virtual virus population was obtained in a preliminary simulation consisting of a clone passaged ten times at a mutation rate (U) of 0.15 mutations per genome and replication round, a value which is used as the reference mutation rate throughout this study, based on average mutation rates determined for RNA viruses [60–62]. The initial population reached a mutation-selection balance [63] and a constant fraction of DI particles. A simulation begins with c_0 initial S cells that are infected at a given MOI (arbitrarily chosen between 0.01 and 3 PFU/cell) by the initial virus population, according to a Poisson distribution whose mean is the MOI. The infection continued until either the virus was exhausted or all the cells received the maximum number of virus particles allowed ($\max VirusCell$). The S cells became E cells, and the simulation proceeded according to the parameters listed in the Text S1 and Table S1. An agent-based computational implementation of the model has been developed using MATLAB®. Details of the software will be published elsewhere and provided upon request.

Computational simulations using the genosets model, and comparison with the experimental results

The computational model (described in Materials and Methods, with the invariant model parameters given in the Text S1 and Table S1) predicts that when the mutation rate U is 0.15 mutations per genome and replication round (m/g/r), infectious progeny production should decrease as the MOI increases because of homologous interference (autointerference) exerted by DI particles (Figure 4A). In contrast, the converse is predicted when U is increased to values of 4.5 to 7.5 m/g/r, ($p < 0.001$, General Linear Model). These higher U values necessitate enhanced mutagenesis over the basal levels displayed by RNA viruses [62,60,61] (Figure 4A). When an arbitrary time factor spanning values of 1 to 2.5 was considered, the decrease in infectious progeny production with the MOI was only predicted at late times ($t = 2.5$) when U was 0.15 m/g/r. However, with a U of 6 m/g/r the infectious yield increased with the MOI at all times tested ($t = 1, 2, 2.5$) (Figure 4B). When the total extracellular progeny (infectious and non-infectious, taken as the total amount of viral RNA) was considered, an increase in total progeny production with the MOI was consistently observed taking a U of 6 m/g/r, but not a U of 0.15 m/g/r (Figure 4C). The model predictions regarding the effect of MOI and time of infection on progeny production (Fig. 5B and 5C) are consistent with the experimental results (Fig. 2B and 2C).

With a mutation rate U of 0.15 m/g/r, the model anticipates no significant differences among the mutation frequencies at the three MOI tested ($p = 0.063$; one-way ANOVA test), which is the result found with VSV in the absence of FU (Table 2). However, at U of 4.5 or 7.5 m/g/r the model predicts significant differences in mutation frequency at the three MOI tested ($p < 0.001$, for both $U = 4.5$ m/g/r and $U = 7.5$ m/g/r; one-way ANOVA test) (Table 3). Post Hoc analysis shows that at both U of 4.5 m/g/r and U of 7.5 m/g/r, the mutation frequency at a MOI of 3 PFU/cell is significantly lower than the mutation frequencies at a MOI of 1 PFU/cell and 0.1 PFU/cell, ($p < 0.001$ in all cases, Post-Hoc Bonferroni analysis); also, the mutation frequency at a MOI of 1 PFU/cell is significantly greater than the mutation frequency at a MOI of 0.1 PFU/cell ($p < 0.001$ in all cases, Post-Hoc Bonferroni analysis), as found experimentally (Table 1). The theoretical model also predicted that the higher the MOI, the earlier the initiation of

viral production (Figure 5A), and this was verified experimentally (Figure 5B).

To explore to what extent the effect of MOI on infectious progeny production is affected by *cis-trans* interactions, simulations were carried out with the computational model either with no *trans* interactions allowed ($cisR = 1$, $transR = 0$), or with *cis* and *trans* interactions allowed ($cisR = 0.25$; $transR = 0.75$). A significant interaction between the MOI and the degree of *cis-trans* interactions, $cisR$, was observed both for $U = 4.5$ m/g/r and $U = 7.5$ m/g/r, ($p < 0.005$ in both cases, General Linear Model) indicating that the lower $cisR$, the higher the effect of the MOI on infectious progeny production.

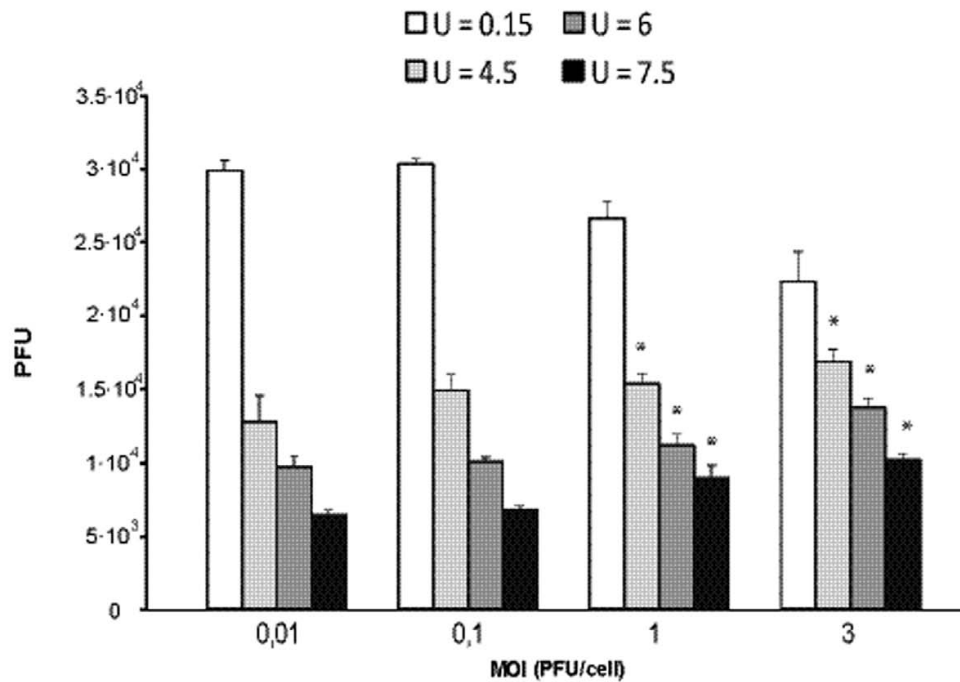
Influence of prior mutagenesis of encephalomyocarditis virus on the multiplicity of infection-dependent inhibition by 5-fluorouracil

The different influence of the MOI on the inhibition of infectious progeny production by FU observed for different RNA viruses was intriguing (Tables 2 and 3). We considered that the different behavior of the viruses tested could be related to an easier production of DIs by LCMV and VSV than by FMDV and EMCV. Although DIs and other defective RNAs have been described for FMDV and EMCV [64–69], their interfering activity is generally less pronounced than that exerted by DIs of negative strand RNA viruses [70,37,59]. Since passages of virus increases the complexity of mutant spectra [4,7], we investigated whether passage of EMCV could render the inhibition by FU MOI-dependent. The virus passaged 20 times in the absence or presence of ribavirin (R), a drug that is mutagenic for picornaviruses [71–73], showed a statistically significant increase of the inhibition by FU at low MOI relative to high MOI ($p = 0.012$, $p = 0.047$, respectively; General linear model) (Figure 6). The result implies also that the MOI dependence of the FU inhibition of progeny production can be influenced by a population context provided by the passage history of a virus.

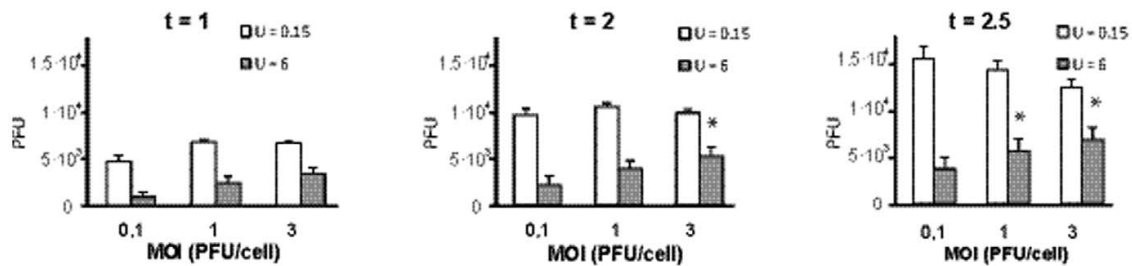
LCMV coinfections and reinfections in BHK-21 cells

Interference can be the result of mutated, defective genomes that act on infectious genomes contained in the same cell, or mutated genomes that are released from the cells where they are produced and then can reinfect other cells together or sequentially with standard infectious virus. To test whether a cell infected with LCMV could be reinfect by another LCMV (that is, that there is no superinfection exclusion that would preclude interference by externally added mutants), we used trisegmented versions of recombinant LCM viruses (r3LCMV) [74] expressing either RFP (r3LCMV/RFP) or GFP (r3LCMV/GFP). Cells were first infected with r3LCMV/RFP at MOIs of 0.001, 0.01, 0.1, 1 or 10 PFU/cell, and the infection monitored based on intracellular RFP expression. The first red cells could be detected at 24 h p.i. in the infections carried out at MOIs of 0.001, 0.01 or 0.1 PFU/cell, and at 8 h p.i. at a MOI of 1 or 10 PFU/cells (Figs. 7A and S1). At 0, 4, 8, 12 and 24 h after the first infection, the cells were infected with r3LCMV/GFP at a MOI of 0.1 PFU/cell. Replication of the second virus (green cells) was not observed in any case (independent on the time between both infections) in cells that had been infected with r3LCMV/RFP at high MOI (Figs. 7A and S1). In cells infected with r3LCMV/GFP at low MOI, replication of the second virus (r3LCMV/GFP) was observed when the time between infections was 12 h or less (Figs. 7B and S1). Thus, superinfections were heavily restricted in BHK-21 cells under the infection conditions used. This has been introduced in the extended lethal defection model by allowing new virus particles

A



B



C

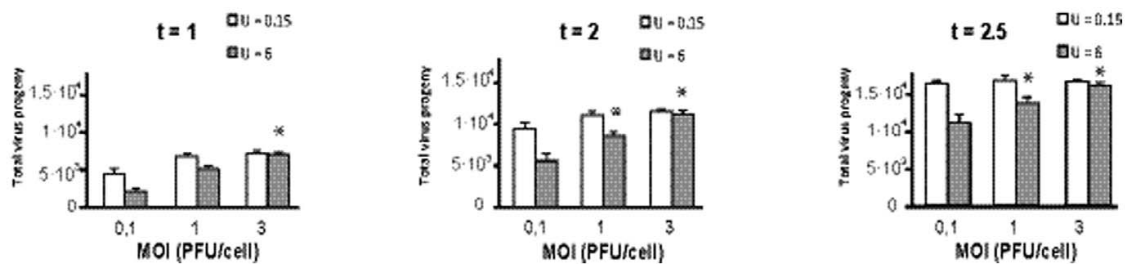


Figure 4. Viral production as a function of the multiplicity of infection (MOI) using the computational model developed in the present study (described in Materials and Methods and the Text S1). The asterisks above the bars indicate those inhibitions that are significantly different from those obtained at the lowest MOI in each simulation. A. Production of infectious virus (here termed PFU in the ordinate) at low ($U = 0.15$), medium ($U = 4.5$) and high ($U = 6$ and $U = 7.5$) genomic mutation rate (mutations per genome and round of copying) for different MOIs. B. Time dynamics of infectious virus production at different MOI and $U = 0.15$ and $U = 6$. Time is expressed in arbitrary units. C. Same as B but with infectious and noninfectious virus, equivalent to total virus progeny. The parameters used are listed in Text S1 and Table S1, but in the simulations performed in B and C the number of cells was reduced to 500. The results are the average of five simulations and the error bars are the standard deviations of those five simulations.
doi:10.1371/journal.pone.0032550.g004

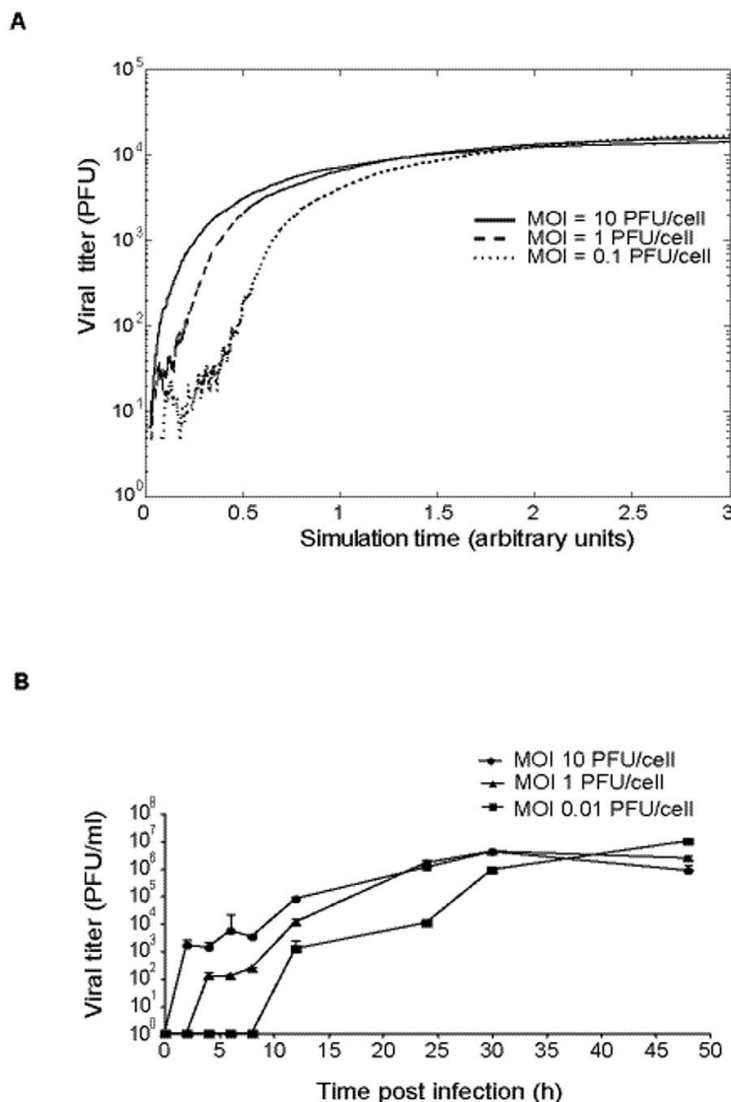


Figure 5. Kinetics of infectious progeny production as a function of the MOI, as predicted the theoretical model, and determined experimentally. A. Computational simulation of infections at MOI of 0.1, 1 and 10 PFU/cell. The parameters used are listed in Text S1 and Table S1. B. Experimental results: BHK-21 cells were infected with LCMV Arm53 at MOIs of 0.01, 1 and 10 PFU/cell, and supernatants were harvested at the indicated times postinfection and titrated. Viral titers are the average of at least four determinations and standard deviations are given. Procedures are described in Materials and Methods.
doi:10.1371/journal.pone.0032550.g005

Table 3. Computer simulations of the mutation frequency and percentage of inhibition of viral infectious progeny production, as a function of the multiplicity of infection (MOI) and of the *cis-trans* interactions.

MOI (PFU/cell)	Mutation frequency ^a (mut/genome//mut/nt)	% Inhibition progeny production relative to U = 0.15 ^b	Mutation frequency ^a (mut/genome//mut/nt)	% Inhibition progeny production relative to U = 0.15 ^b
<i>cisR</i> = 0.25			<i>cisR</i> = 1	
Average number of mutations per genome, U = 0.15				
0,1	1.09±0.52//7.3±3.5×10 ⁻⁴	-	1.88±0.92//1.3±0.6×10 ⁻³	-
1	1.41±0.65//9.4±4.3×10 ⁻⁴	-	1.55±0.34//1.0±0.2×10 ⁻³	-
3	1.63±0.09//1.1±0.1×10 ⁻³	-	1.68±0.16//1.1±0.1×10 ⁻³	-
Average number of mutations per genome, U = 4.5				
0,1	8.93±0.48//6.0±0.3×10 ⁻³	54±4	9.12±1.06//6.1±0.7×10 ⁻³	41±4
1	7.38±0.54//4.9±0.4×10 ⁻³	44±9	6.90±0.76//4.6±0.5×10 ⁻³	31±5
3	5.79±0.17//3.9±0.1×10 ⁻³	28±9	5.31±0.14//3.5±0.09×10 ⁻³	23±4
Average number of mutations per genome, U = 7.5				
0,1	12.57±0.59//8.4±0.4×10 ⁻³	77±2	11.21±0.94//7.5±0.6×10 ⁻³	60±5
1	10.59±0.21//7.1±0.1×10 ⁻³	68±1	9.26±0.47//6.2±0.3×10 ⁻³	50±3
3	8.52±0.11//5.68±0.07×10 ⁻³	53±4	7.59±0.09//5.1±0.6×10 ⁻³	43±2

^aThe mutation frequency is the average of ten simulations and is expressed as the number of mutations per genome (mut/genome) or mutations per nucleotide (mut/nt).

^bThe inhibition of infectious virus progeny production is calculated according to $I(U) = (1 - \frac{V(U)}{V(U=0.15)}) \times 100$, where, $V(U=0.15)$ is the number of viable progeny viruses (the equivalent of viral titer) when the mutation rate is U = 0.15 mutations/genome/replication round, and $V(U)$ is the number of viable progeny viruses when the mutation rate is U = 4.5 or U = 7.5. Results are the average of ten simulations.

doi:10.1371/journal.pone.0032550.t003

to enter *E* cells but not *I* cells. The inability of defective interfering particles to superinfect a cell was previously documented for poliovirus [75]. Coinfection of the same cell by the two LCMV versions was allowed, as suggested by the cells that included both the red and green markers (yellow cells, color merge), detected at time 0 between infections (Figures 7B and S1). Therefore, interference by genomes introduced by external LCMV particles requires the simultaneous infection by standard and interfering virus because superinfections appear to be highly restricted. The absence of reinfections implies that interference in a cell will be exerted essentially by interfering genomes generated in the same cell.

Discussion

The continuous presence of a dynamic mutant spectrum in replicating RNA virus populations is a fundamental feature of RNA viruses that exerts a profound influence in their biology, and can jeopardize strategies to control viral disease [7,8,4]. Mutagenic nucleoside analogues are currently being investigated as antiviral agents because they can promote RNA virus extinction through lethal mutagenesis [[52,50,76,51,30,33,77,78,53,73,79–81]; reviewed in [11,12,9]]. Examination of the events that accompany FU-mediated extinction of LCMV [31,33,27,34,30,32] led to the proposal of lethal defection as a mechanism of virus extinction [30]. The basic concept behind the lethal defection model is that some functionally altered genomes or gene products that are generated upon replication under enhanced mutagenesis interfere with replication of the more competent genomes, thus contributing to the replicative collapse of the entire viral population. Since its formulation, the lethal defection model has been supported by additional experimental results obtained with LCMV and other RNA viruses, as well as by theoretical studies [76,36,47,33,45,30,35,49,82]. The present investigation was undertaken to explore with LCMV, a

system with a high endogenous production of defective genomes, the effect of the infecting viral dose on mutagen-induced virus extinction. The inhibitory activity of FU on infectious progeny production of LCMV was more pronounced in infections carried out at low than at high MOI, accompanied of a larger increase of mutant spectrum complexity in the progeny populations. While VSV, another negative strand RNA virus, behaved similarly to LCMV, a low MOI did not enhance either the inhibition by FU or the mutant spectrum complexity of FMDV and EMCV (compare Figures 1, 2 and Tables 1, 2). The results with VSV are in agreement with early quantifications of the effect of FU mutagenesis with VSV by Holand and colleagues [77]. The difference observed may be influenced by the lower tendency of the positive strand RNA picornaviruses to establish interactions in *trans* as compared with negative strand RNA viruses [83,84]. This is suggested by modest MOI-dependent progeny production acquired by EMCV upon passage in BHK-21 cells (Figure 6). Thus, passage history, related to production of, defective genomes, might be the relevant factor irrespective of the virus being of positive or negative sense RNA. The most abundant mutation types expected from FU-mediated mutagenesis are A→G and U→C transitions [52,53,80,85,50], and these are also those observed in the present experiments (Tables 1 and 2). In the case of LCMV, the most frequent transitions were A→G for gene L and U→C for Z (Table 1).

An approach to validate the experimental results using totally different tools has been to test whether the results are consistent with theoretical predictions. To this aim, we have developed an extended model inspired in previous versions of the lethal defection model developed by Manrubia and her colleagues [30,46,35]. The main features of this extended model are: i) cell coinfection is included; ii) an adjustable degree of *trans*-interaction is explicitly taken into account; iii) DF's are considered as a subclass of standard virus-dependent defectors; and iv) both replication and release of viral progeny from the cell can be affected by the mutation frequency. The model reproduces correctly the kinetics

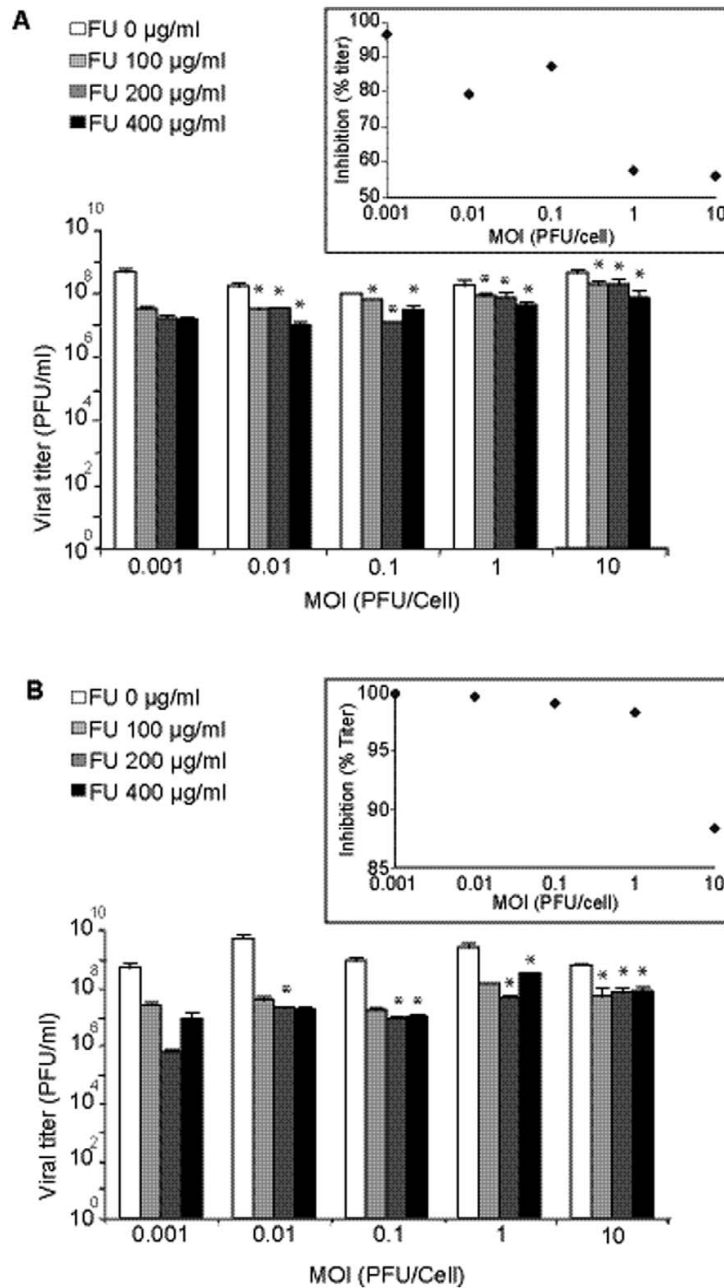


Figure 6. Effect of the multiplicity of infection (MOI) on the inhibition of mutagenized and non-mutagenized EMCV progeny production by 5-fluorouracil (FU). A. BHK-21 cells were infected with EMCV passed 20 times in absence of ribavirin at the indicated MOI, in the absence (white bars) or presence of different concentrations of FU (increasingly dark bars), as indicated in each panel. Cell culture supernatants were harvested at 24 h p.i. and titered. Viral titers are the average of at least three determinations and standard deviations are given. The inset visualizes the variation of the percentage of inhibition (by 200 µg/ml FU) as a function of the MOI. B. Same experiment, but using a EMCV passed 20 times in the presence of 800 µM ribavirin. The asterisks above the bars indicate the FU-inhibition values that are significantly different from those obtained with the corresponding lowest MOI tested. The inset is as in panel A. Procedures are described in Materials and Methods.
 doi:10.1371/journal.pone.0032550.g006

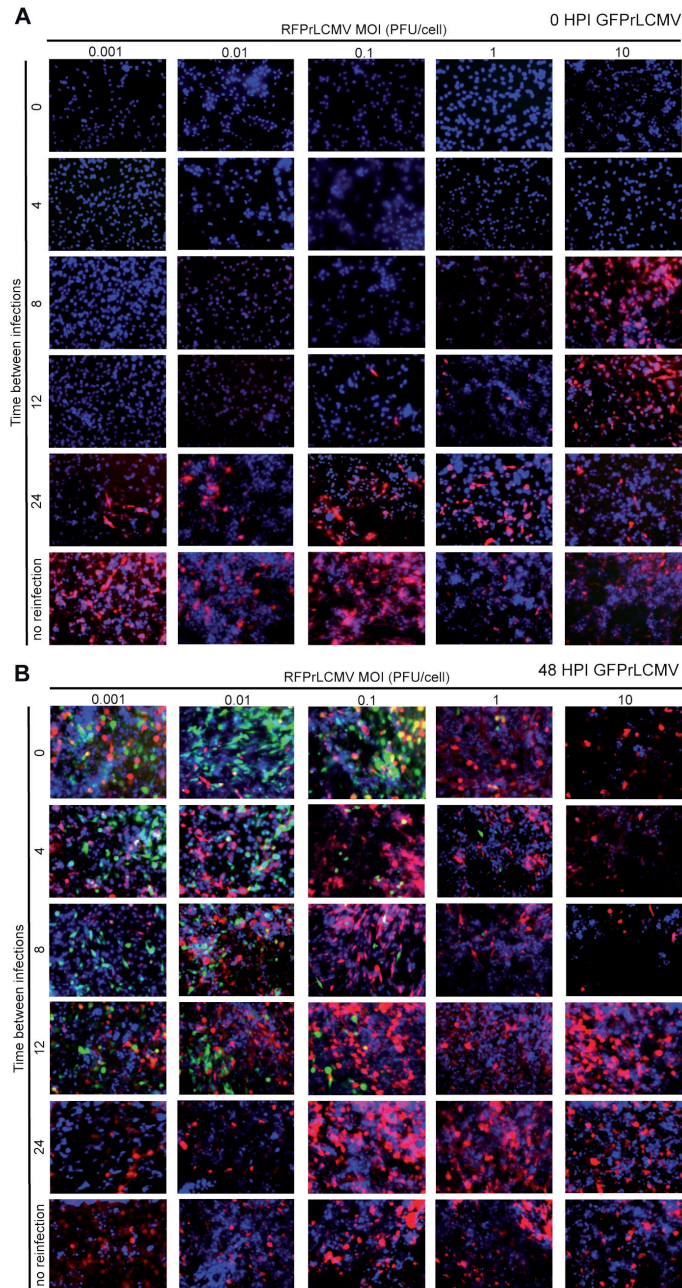


Figure 7. LCMV coinfections and reinfections of BHK-21 cells. Cells were infected with RFPrLCMV at the indicated MOI. At 0, 4, 8, 12 or 24 h p.i. cells were re-infected with GFPPrLCMV at a MOI of 0.1 PFU/cell. The different panels show representative images of infected cells at 0 (A) and 48 (B) h p.i. with GFPPrLCMV. Magnification is 20-fold. Nuclei were stained with DAPI. The origin of the marked RFPrLCMV and GFPPrLCMV and procedures for the infections are described in Materials and Methods. Additional images of coinfections and reinfections at different MOI, and controls are depicted in Figures S1, S2 and S3.
doi:10.1371/journal.pone.0032550.g007

of progeny production and autointerference of LCMV observed at high MOI [86,42,87] (Figures 4 and 5). The model also reproduces the negative correlation between the inhibition of infectious virus production by FU and the MOI when the mutation rate is increased. In infections carried out at low initial MOI a larger number of infection rounds are needed to infect all

the cells and, therefore, viruses can acquire a larger number of mutations per genome. In contrast, high MOI increases the number of initial infections, and reduces the number of replication rounds needed to reach the plateau of virus production. As a consequence, the viruses accumulate a lower average number of mutations, as reflected in the decrease in the mutation frequency

(Table 3). An increase of the mutation frequency at low MOI favors the production of mutant and defector viruses, which in turn decrease the infectious progeny production. The lower progeny production of LCMV at high MOI may be due to interfering genomes and subsequent autointerference [86,87]. The effect was noticed at late times presumably because interfering genomes had accumulated (Figure 1).

Results of infections with differentially labeled LCMVs indicated that while coinfections are allowed, superinfection is strongly restricted in BHK-21 cells (Figure 7). Restriction of superinfection was also observed with Junin virus in persistently infected BHK and Vero cells [88,89]. Thus, interference and autointerference depend on the coinfection of cells by standard and defective genomes, and on the intracellular generation of mutant genomes, favored by FU mutagenesis.

Our experimental findings, supported by the extended lethal defection model, are relevant to the planning of lethal mutagenesis protocols because lower mutagenic intensities may be sufficient to achieve the extinction of viruses that are prone to produce defective genomes during their natural infectious cycle. It will be of interest to compare the effect of sequential and combination treatments involving a mutagenic agent and a non-mutagenic inhibitor [82,85,90,76] on viruses prone to generate and tolerate a higher basal level of defective genomes (without an added mutagen) and on viruses restricted in defective genome generation and tolerance.

Materials and Methods

Cells, virus and infections

Growth of BHK-21 and Vero cells and virus infections were carried out as previously described [31,91,50,27,30,33,32]. LCMV ARM 53b is a triple plaque-purified clone from ARM CA 1371, passaged four times in BHK-21 cells. An LCMV virus stock (termed p0) was prepared by infecting BHK-21 monolayers (3×10^6 cells in 100 mm-diameter dishes) with 0.01 PFU of LCMV ARM 53b per cell. The p0 virus preparation was used for all the experiments. Other viruses employed are the Mudd-Summers strain of the Indiana serotype of VSV [92], clone C-S8c1 of FMDV [93], and the Rueckert strain of EMCV [94]. Procedures for LCMV infection have been described [33,27,32,31,30]. Briefly, semiconfluent monolayers of BHK-21 cells (3×10^6 cells in 100 mm-diameter dishes) were infected with LCMV ARM 53b p0 at different MOIs. After a 90 min adsorption period at 37°C and 7% CO₂, the inocula were removed and the monolayers washed with Dulbecco modified Eagle medium (DMEM). The infected cultures were maintained in 10 ml of DMEM supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 2% L-glutamine, 0.52% glucose, 50 µg/ml gentamicin, either in the absence or the presence of FU (concentrations indicated in each experiment) at 37°C and 7% CO₂. Supernatants of the infected cell cultures were sampled at different times postinfection (p.i.) and stored at -80°C. The infectivity of extracellular virus was determined by plaque assay on Vero cell monolayers as follows: 10^6 cells per well in six-well dishes were infected by applying 300 µl of a dilution of the culture medium to be tested; after 90 minutes of adsorption at 37°C and 7% CO₂, the monolayers were washed with DMEM and overlaid with 4 ml of DMEM 1% FCS, 1% DEAE-Dextran, 2% L-glutamine, 50 µg/ml gentamicin and 0.3% agar. After 7 days, cells were stained with 2% crystal violet in 2% formaldehyde, and viral plaques were counted. Supernatants from mock-infected cultures maintained in parallel were titrated to monitor the absence of viral contamination. No contamination (cytopathology or plaques) was detected in the control cultures throughout the experiments.

Infections of BHK-21 cells with FMDV, EMCV and VSV (6×10^6 cells in 100 mm-diameter dishes) at different MOI were

done as described [95,93,96]. The infected cultures were harvested 24 hours (h) p.i. and stored at -80°C. Virus infectivity was determined by plaque assay on BHK-21 cell monolayers as follows: 10^6 cells in each of 35 mm-diameter dishes were infected by applying 100 µl of serial dilutions of the culture medium; after 60 minutes of adsorption at 37°C and 7% CO₂, the monolayers were washed with DMEM and overlaid with 4 ml of DMEM 1% FCS, 1% DEAE-Dextran, 50 µg/ml gentamicin and 0.5% agar. After 24 h, cells were stained with 2% crystal violet in 2% formaldehyde, and viral plaques were counted. Titers shown are the mean of at least three determinations. Again, mock-infected cultures were maintained in parallel to ascertain the absence of undesired viral infections.

To study the permissivity of BHK-21 cells to superinfection by LCMV, we used trisegmented versions of LCMV [74] engineered to express either the red fluorescent protein (RFP) (r3LCMV/RFP) or the green fluorescent protein (GFP) (r3LCMV/GFP). Semiconfluent monolayers of BHK-21 cells (1×10^6 cells in 16 mm-diameter dishes) were infected with RFP-LCMV at different MOIs. Then the cell monolayers were washed, and the cells reinfected with GFP-LCMV at a MOI of 0.1 PFU/cell, at different times after the first infection. At 0 and 48 h after the second infection, the cells were fixed with 4% formaldehyde, washed two times with PBS, and cell nuclei were counterstained using DAPI for 10 minutes, and then maintained in PBS (100 µl/well) [74]. An inverted Axiovert S100 Zeiss fluorescence microscope was used to visualize the samples.

Treatment with 5-fluorouracil

Preparation of FU stock solutions, determination of FU toxicity for BHK-21 cells, and procedures for viral infections in the presence of FU have been described [30,50].

RNA Extraction, reverse transcription-PCR, nucleotide sequencing, and determination of mutant spectrum complexity

RNA was extracted from supernatants of infected cultures using Trizol (Invitrogen), following the manufacturer's protocol. Triplicate RNA samples were amplified by reverse transcription-PCR (RT-PCR) using *RT transcriptase* (Roche) and *PFU* DNA polymerase (Promega). To ascertain that an excess of template was amplified and that the amount of template was not limiting during the RT-PCR amplification, a 1:10 and 1:100 dilution of the RNA was subjected to RT-PCR in parallel. Positive amplifications with the diluted template ensured that there was no limitation in the amount of viral RNA molecules as template for the RT-PCR amplification carried out with undiluted RNA [72]. cDNAs were purified with a Wizard PCR purification kit (Promega), pGEM-T Easy Vector (Promega), and cloned in *Escherichia coli* DH5α. cDNA from individual bacterial colonies was amplified with Templiphi (GE Healthcare). The oligonucleotides used for amplification of two LCMV genomic regions were: L3654 (forward 5'- AGT TTA AGA ACC CTT CCC GC - 3') and L4260 (reverse 5' CGA GAC ACC TTG GGA GTT GTG C - 3') for the polymerase region; L7 (forward 5'- GGG GAT CCT AGG CGT TTA GT- 3') and L402 (reverse 5'- GGA ACC GCA CGT CGC CCA ACG CAC - 3') for the Z gene. The number in the primer designation corresponds to the 5' nucleotide position, and refers to the consensus genomic RNA sequence determined previously [31] [GenBank accession numbers AY847351(L) and AY847350(S)]. The oligonucleotides used for amplification of a fragment of the polymerase gene of VSV, FMDV and EMCV were L5902F (forward 5'- GCAAGTGATTTAGCTCGGATT - 3'; residues 5903-5923) and L6569R (reverse 5'- GGTGGTTATTC-

CATTTTTCG - 3' residues 6569-6550) for VSV; 3DR3 (forward 5'- CAAAGATGTCTGCGGAGGACAA - 3'; residues 6800-6821) and AV3 (reverse 5'- TTCATGGCATCGCTGCAGTGG - 3'; residues 7370-7350) for FMDV; EM67D (forward 5'- CAGCCACCCTGATCCCGTTTGC - 3'; residues 6718-6739) and EM73R (reverse 5'- CTTATATCCTGTCTTTGCGAGGC - 3'; residues 7403-7381) for EMCV. Nucleotide positions correspond to genomic RNAs that have been previously described [97–99]. To characterize the mutant spectra of the viral quasiespecies, 20 to 48 clones per sample were sequenced (7,800 to 32,000 nt per population). The complexity of the quasiespecies was characterized by means of two parameters: (i) mutation frequency (average number of mutations per nucleotide sequenced, relative to the consensus sequence of the corresponding mutant spectrum) and (ii) Shannon entropy, a measure of the proportion of genomes that are different in the mutant spectrum of the quasiespecies. To calculate the mutation frequency, repeated mutations found in the same quasiespecies were counted only once (minimum mutation frequency). Shannon entropy was calculated with the formula: $S_n = -[\sum_i (p_i \times \ln p_i)] / \ln N$, in which p_i is the frequency of each sequence in the quasiespecies and N is the total number of sequences compared. A Shannon entropy value of 0 indicates that all of the sequences are identical whereas a value of 1 indicates that each genome differs from the others in its nucleotide sequence [100].

LCMV RNA quantification

RT and real-time quantitative PCR were carried out using the Light Cycler DNA Master SYBR Green I kit (Roche), according to the manufacturer's instructions. The polymerase region was amplified with primers L4183 (forward 5' - ATC GAG GCC ACA CTG ATC TT - 3') and L4260 (same numbering for primer location as described for RT-PCR amplification). An LCMV RNA fragment spanning nucleotides 3662 to 4268 was used as standard. This was obtained as a runoff transcript from a molecular DNA clone encoding the polymerase-coding region in the genomic sense, cloned into pGem-T Easy Vector (Promega). The denaturation curve of the amplified DNAs was determined to monitor the specificity of the amplification. Negative controls (without template RNA) were run in parallel with each amplification reaction. Each value of the amount of LCMV RNA is the average of at least three determinations. This procedure for LCMV RNA quantification was used previously [33,30].

Statistical analyses

General linear model. To study the interaction between the MOI and the inhibition of virus progeny production by FU for different viruses, a multivariate general linear model was used according to the formula:

$$\log_{10} PFU = \alpha_0 + \alpha_1 FU + \alpha_2 \log_{10} MOI + \alpha_3 FU \log_{10} MOI$$

in which FU is the concentration of FU, MOI is the multiplicity of infection, α_0 is the ordinate at the origin, α_1, α_2 are the regression coefficients that express the variation of log PFU with respect to each

of the independent variables, and α_3 is the coefficient that expresses the interaction among different variables. A positive interaction coefficient α_3 indicates that one variable accentuates the effect of the other; in this case, an increase of the MOI would increase the inhibitory effect of FU. A negative interaction coefficient indicates that one variable decreases the effect of the other; in this case, an increase in the MOI would decrease the inhibitory effect of FU.

Supporting Information

Figure S1 LCMV coinfections and reinfections of BHK-21 cells. BHK-21 cells were infected with RFPvLCMV at MOI of 0.001 (A and B), 0.01 (C and D). After 0, 4, 8, 12 or 24 h p.i. cells were re-infected with GFPvLCMV at a MOI of 0.1 PFU/cell. Panels depict the infected cells at 0 (A and C) and 48 (B and D) h after the GFPvLCMV infection (nucleus stained with DAPI, cells expression, RFP, GFP and merged image of the three panels). Magnification is 20-fold. Procedures are detailed in Materials and Methods and conclusions in the main text. (TIF)

Figure S2 LCMV coinfections and reinfections of BHK-21 cells. BHK-21 cells were infected with RFPvLCMV at MOI of 0.1 (E and F), 1 (G and H). After 0, 4, 8, 12 or 24 h p.i. cells were re-infected with GFPvLCMV at a MOI of 0.1 PFU/cell. Panels depict the infected cells at 0 (E and G) and 48 (F and H) h after the GFPvLCMV infection (nucleus stained with DAPI, cells expression, RFP, GFP and merged image of the three panels). Magnification is 20-fold. Procedures are detailed in Materials and Methods and conclusions in the main text. (TIF)

Figure S3 LCMV coinfections and reinfections of BHK-21 cells. BHK-21 cells were infected with RFPvLCMV at MOI of 10 PFU/cell (I and J) and MOCK (K and L). After 0, 4, 8, 12 or 24 h p.i. cells were re-infected with GFPvLCMV at a MOI of 0.1 PFU/cell. Panels depict the infected cells at 0 (I and K) and 48 (J and L) h after the GFPvLCMV infection (nucleus stained with DAPI, cells expression, RFP, GFP and merged image of the three panels). Magnification is 20-fold. Procedures are detailed in Materials and Methods and conclusions in the main text. (TIF)

Table S1 Parameters used in the model. (DOCX)

Text S1 Genoset-associated functions. (DOCX)

Acknowledgments

We thank A. I. de Ávila and I. Gallego for expert technical assistance.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: HM JCT ED VM. Performed the experiments: HM VM. Analyzed the data: HM HT JCT ED VM. Contributed reagents/materials/analysis tools: HT JCT ED. Wrote the paper: HT JCT ED VM. Development of theoretical model: HT.

References

- Domingo E, Sabo D, Taniguchi T, Weissmann C (1978) Nucleotide sequence heterogeneity of an RNA phage population. Cell 13: 735–744.
- Eigen M (1971) Self-organization of matter and the evolution of biological macromolecules. Naturwissenschaften 58: 465–523.
- Eigen M, Schuster P (1977) The hypercycle — a principle of natural self-organization. Part A: Emergence of the hypercycle. Naturwissenschaften 64: 541–565.
- Domingo E, ed (2006) Quasiespecies: Concepts and Implications for Virology. Current Topics in Microbiology and Immunology 299: 1–401.
- Eigen M, Biebricher CK (1988) Sequence space and quasiespecies distribution. In: Domingo E, Ahlquist P, Holland JJ, eds. RNA Genetics. Boca Raton, FL: CRC Press. pp 211–245.
- Mas A, Lopez-Galindez C, Cacho I, Gomez J, Martinez MA (2010) Unfinished stories on viral quasiespecies and Darwinian views of evolution. J Mol Biol 397: 865–877.
- Perales C, Lorenzo-Redondo R, Lopez-Galindez C, Martinez MA, Domingo E (2010) Mutant spectra in virus behavior. Future Virol 5: 677–698.

8. Lauring AS, Andino R (2010) Quasispecies theory and the behavior of RNA viruses. *PLoS Pathog* 6: e1001005.
9. Graci JD, Cameron CE (2008) Therapeutically targeting RNA viruses via lethal mutagenesis. *Future Virol* 3: 553–566.
10. de la Torre JC (2005) Arenavirus extinction through lethal mutagenesis. *Virus Res* 107: 207–214.
11. Anderson JP, Daifuku R, Loeb LA (2004) Viral Error Catastrophe by Mutagenic Nucleosides. *Annu Rev Microbiol* 58: 183–205.
12. Domingo E, ed (2005) Virus entry into error catastrophe as a new antiviral strategy. *Virus Res* 107: 115–228.
13. Loeb LA, Essigmann JM, Kazazi F, Zhang J, Rose KD, et al. (1999) Lethal mutagenesis of HIV with mutagenic nucleoside analogs. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 1492–1497.
14. Fox EJ, Loeb LA (2010) Lethal mutagenesis: targeting the mutator phenotype in cancer. *Semin Cancer Biol* 20: 353–359.
15. Peters CJ (2002) Human infection with arenaviruses in the Americas. *Curr Top Microbiol Immunol* 262: 65–74.
16. Macher AM, Wolfe MS (2006) Historical Lassa fever reports and 30-year clinical update. *Emerg Infect Dis* 12: 835–837.
17. Buchmeier MJ, de la Torre JC, Peters CJ (2007) Arenaviridae: The viruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields Virology*. Philadelphia, P. A.: Lippincott Williams & Wilkins. pp 1791–1827.
18. Fischer SA, Graham MB, Kuehnert MJ, Kotton CN, Srinivasan A, et al. (2006) Transmission of lymphocytic choriomeningitis virus by organ transplantation. *N Engl J Med* 354: 2235–2249.
19. Buchmeier MJ, Bowen MD (2001) Arenaviridae: The viruses and their replication. *Fields Virology*; Knipe DM, Philadelphia PM, eds. Philadelphia, PA: Lippincott Williams and Wilkins. pp 1635–1668.
20. Southern PJ (1996) Arenaviridae: the viruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields in Virology*, 3rd Ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Press. pp 1505–1519.
21. Salvato MS, Schweighofer KJ, Burns J, Shimomaye EM (1992) Biochemical and immunological evidence that the 11 kDa zinc-binding protein of lymphocytic choriomeningitis virus is a structural component of the virus. *Virus Res* 22: 185–198.
22. Pérez M, Craven RC, de la Torre JC (2003) The small RING finger protein Z drives arenavirus budding: implications for antiviral strategies. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 12978–12983.
23. Fuller-Pace FV, Southern PJ (1989) Detection of virus-specific RNA-dependent RNA polymerase activity in extracts from cells infected with lymphocytic choriomeningitis virus: in vitro synthesis of full-length viral RNA species. *J Virol* 63: 1938–1944.
24. Singh MK, Fuller-Pace FV, Buchmeier MJ, Southern PJ (1987) Analysis of the genomic L RNA segment from lymphocytic choriomeningitis virus. *Virology* 161: 448–456.
25. Lee KJ, Novella IS, Teng MN, Oldstone MB, de la Torre JC (2000) NP and L proteins of lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) are sufficient for efficient transcription and replication of LCMV genomic RNA analogs. *J Virol* 74: 3470–3477.
26. Lopez N, Jacamo R, Franze-Fernandez MT (2001) Transcription and RNA replication of tacaribe virus genome and antigenome analogs require N and L proteins: Z protein is an inhibitor of these processes. *J Virol* 75: 12241–12251.
27. Grande-Pérez A, Sierra S, Castro MG, Domingo E, Lowenstein PR (2002) Molecular indeterminism in the transition to error catastrophe: systematic elimination of lymphocytic choriomeningitis virus through mutagenesis does not correlate linearly with large increases in mutant spectrum complexity. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 12938–12943.
28. Domingo E (2007) Virus evolution. In: Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. pp 389–421.
29. Emonet SF, de la Torre JC, Domingo E, Sevilla N (2009) Arenavirus genetic diversity and its biological implications. *Infect Genet Evol* 9: 417–429.
30. Grande-Pérez A, Lazaro E, Lowenstein P, Domingo E, Manrubia SC (2005) Suppression of viral infectivity through lethal defection. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 4448–4452.
31. Grande-Pérez A, Gómez-Mariano G, Lowenstein PR, Domingo E (2005) Mutagenesis-induced, large fitness variations with an invariant arenavirus consensus genomic nucleotide sequence. *J Virol* 79: 10451–10459.
32. Martín V, Grande-Pérez A, Domingo E (2008) No evidence of selection for mutational robustness during lethal mutagenesis of lymphocytic choriomeningitis virus. *Virology* 378: 185–192.
33. Martín V, Abia D, Domingo E, Grande-Pérez A (2010) An interfering activity against lymphocytic choriomeningitis virus replication associated with enhanced mutagenesis. *J Gen Virol* 91: 990–1003.
34. Ruiz-Jarabo CM, Ly C, Domingo E, de la Torre JC (2003) Lethal mutagenesis of the prototypic arenavirus lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV). *Virology* 308: 37–47.
35. Irazo J, Manrubia SC (2009) Stochastic extinction of viral infectivity through the action of defectors. *Europhys Lett* 85: 18001.
36. Perales C, Mateo R, Mateu MG, Domingo E (2007) Insights into RNA virus mutant spectrum and lethal mutagenesis events: replicative interference and complementation by multiple point mutants. *J Mol Biol* 369: 985–1000.
37. Roux L, Simon AE, Holland JJ (1991) Effects of defective interfering viruses on virus replication and pathogenesis in vitro and in vivo. *Adv Virus Res* 40: 181–211.
38. Huang AS, Wu TY, Yilma T, Lanman G (1986) Characterization of virulent isolates of vesicular stomatitis virus in relation to interference by defective particles. *Microb Pathog* 1: 205–215.
39. Welsh RM, O'Connell CM, Plau CJ (1972) Properties of defective lymphocytic choriomeningitis virus. *J Gen Virol* 17: 355–359.
40. Welsh RM, Plau CJ (1972) Determinants of lymphocytic choriomeningitis interference. *J Gen Virol* 14: 177–187.
41. Lehmann-Grube F (1971) Lymphocytic choriomeningitis virus. *Virology Monographs* N°10. New York: Springer.
42. Von Laer DM, Mack D, Kruppa J (1988) Delayed formation of defective interfering particles in vesicular stomatitis virus-infected cells: kinetic studies of viral protein and RNA synthesis during autointerference. *J Virol* 62: 1323–1329.
43. Volkmer N, Soares MC, Rebello MA (1983) Autointerference of Marituba Virus (Bunyaviridae) in mouse L cells by defective interfering particles. *Intervirology* 20: 108–113.
44. Ojonegros S, Beerwinkler N, Antal T, Nowak MA, Escarmis C, et al. (2010) Competition-colonization dynamics in an RNA virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 2108–2112.
45. González-López C, Arias A, Pariente N, Gómez-Mariano G, Domingo E (2004) Preextinction viral RNA can interfere with infectivity. *J Virol* 78: 3319–3324.
46. Perales C, Agudo R, Tejero H, Manrubia SC, Domingo E (2009) Potential benefits of sequential inhibitor-mutagen treatments of RNA virus infections. *PLoS Pathog* 5: e1000658.
47. Crowder S, Kirkegaard K (2005) Trans-dominant inhibition of RNA viral replication can slow growth of drug-resistant viruses. *Nature Genetics* 37: 701–709.
48. Vignuzzi M, Stone JK, Arnold JJ, Cameron CE, Andino R (2006) Quasispecies diversity determines pathogenesis through cooperative interactions in a viral population. *Nature* 439: 344–348.
49. Spagnolo JF, Rossignol E, Bullitt E, Kirkegaard K (2010) Enzymatic and nonenzymatic functions of viral RNA-dependent RNA polymerases within oligomeric arrays. *RNA* 16: 382–393.
50. Sierra S, Dávila M, Lowenstein PR, Domingo E (2000) Response of foot-and-mouth disease virus to increased mutagenesis. Influence of viral load and fitness in loss of infectivity. *J Virol* 74: 8316–8323.
51. Perales C, Agudo R, Manrubia SC, Domingo E (2011) Influence of mutagenesis and viral load in sustained, low-level replication of an RNA virus. *J Mol Biol* 407: 60–78.
52. Agudo R, Arias A, Pariente N, Perales C, Escarmis C, et al. (2008) Molecular characterization of a dual inhibitory and mutagenic activity of 5-fluorouridine triphosphate on viral RNA synthesis. Implications for lethal mutagenesis. *J Mol Biol* 382: 652–666.
53. Agudo R, Arias A, Domingo E (2009) 5-fluorouracil in lethal mutagenesis of foot-and-mouth disease virus. *Fut Med Chem* 1: 529–539.
54. Manrubia SC, Domingo E, Lazaro E (2010) Pathways to extinction: beyond the error threshold. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 365: 1943–1952.
55. Nowak MA, May RM (2000) *Virus Dynamics. Mathematical Principles of Immunology and Virology*. New York: Oxford University Press Inc.
56. Crowell RL, Lonberg-Holm K, eds. *Virus attachment and Entry into Cells*. Washington D.C.: ASM.
57. Holland JJ, Spindler K, Horodyski F, Grabau E, Nichol S, et al. (1982) Rapid evolution of RNA genomes. *Science* 215: 1577–1585.
58. Huang AS, Baltimore D (1970) Defective viral particles and viral disease processes. *Nature* 226: 325–327.
59. Palma EL, Huang AS (1974) Cyclic production of vesicular stomatitis virus caused by defective interfering particles. *J Infect Dis* 126: 402–410.
60. Batschelet E, Domingo E, Weissmann C (1976) The proportion of revertant and mutant phage in a growing population, as a function of mutation and growth rate. *Gene* 1: 27–32.
61. Drake JW, Holland JJ (1999) Mutation rates among RNA viruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 13910–13913.
62. Sanjuan R, Nebot MR, Chirico N, Mansky LM, Belshaw R (2010) Viral mutation rates. *J Virol* 84: 9733–9748.
63. Wilke CO (2005) Quasispecies theory in the context of population genetics. *BMC Evol Biol* 5: 44.
64. McClure MA, Holland JJ, Perrault J (1980) Generation of defective interfering particles in picornaviruses. *Virology* 100: 408–418.
65. Cole CN (1975) Defective interfering (di) particles of poliovirus. *Prog Med Virol* 20: 180–207.
66. Charpentier N, Dávila M, Domingo E, Escarmis C (1996) Long-term, large-population passage of aphthovirus can generate and amplify defective noninterfering particles deleted in the leader protease gene. *Virology* 223: 10–18.
67. García-Arriaza J, Manrubia SC, Toja M, Domingo E, Escarmis C (2004) Evolutionary transition toward defective RNAs that are infectious by complementation. *J Virol* 78: 11678–11685.
68. García-Arriaza J, Ojonegros S, Dávila M, Domingo E, Escarmis C (2006) Dynamics of mutation and recombination in a replicating population of complementing, defective viral genomes. *J Mol Biol* 360: 558–572.
69. Ojonegros S, García-Arriaza J, Escarmis C, Manrubia SC, Perales C, et al. (2011) Viral genome segmentation can result from a trade-off between genetic content and particle stability. *PLoS Genetics* in press.

70. Huang AS (1973) Defective interfering viruses. *Annu Rev Microbiol* 27: 101–117.
71. Crotty S, Maag D, Arnold JJ, Zhong W, Lau JYN, et al. (2000) The broad-spectrum antiviral ribonucleotide, ribavirin, is an RNA virus mutagen. *Nature Medicine* 6: 1375–1379.
72. Airaksinen A, Pariente N, Menendez-Arias L, Domingo E (2003) Curing of foot-and-mouth disease virus from persistently infected cells by ribavirin involves enhanced mutagenesis. *Virology* 311: 339–349.
73. Agudo R, Ferrer-Orta C, Arias A, de la Higuera I, Perales C, et al. (2010) A multi-step process of viral adaptation to a mutagenic nucleoside analogue by modulation of transition types leads to extinction-escape. *PLoS Pathog* 6(8): e1001072.
74. Emonet SF, Garidou L, McGavern DB, de la Torre JC (2009) Generation of recombinant lymphocytic choriomeningitis viruses with trisegmented genomes stably expressing two additional genes of interest. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 3473–3478.
75. Cole CN, Baltimore D (1973) Defective interfering particles of poliovirus. 3. Interference and enrichment. *J Mol Biol* 76: 345–361.
76. Perales C, Agudo R, Domingo E (2009) Counteracting quasispecies adaptability: extinction of a ribavirin-resistant virus mutant by an alternative mutagenic treatment. *PLoS One* 4: e5554.
77. Holland JJ, Domingo E, de la Torre JC, Steinhauer DA (1990) Mutation frequencies at defined single codon sites in vesicular stomatitis virus and poliovirus can be increased only slightly by chemical mutagenesis. *J Virol* 64: 3960–3962.
78. Perales C, Henry M, Domingo E, Wain-Hobson S, Vartanian JP (2011) Lethal mutagenesis of foot-and-mouth disease virus involves shifts in sequence space. *J Virol* press.
79. Pariente N, Sierra S, Airaksinen A (2005) Action of mutagenic agents and antiviral inhibitors on foot-and-mouth disease virus. *Virus Res* 107: 183–193.
80. Pariente N, Sierra S, Lowenstein PR, Domingo E (2001) Efficient virus extinction by combinations of a mutagen and antiviral inhibitors. *J Virol* 75: 9723–9730.
81. Pringle CR (1970) Genetic characteristics of conditional lethal mutants of vesicular stomatitis virus induced by 5-fluorouracil, 5-azacytidine, and ethyl methane sulfonate. *J Virol* 5: 559–567.
82. Iranzo J, Perales C, Domingo E, Manrubia SC (2011) Tempo and mode of inhibitor-mutagen antiviral therapies: a multidisciplinary approach. *Proc Natl Acad Sci USA* in press.
83. Condit RC (2007) Principles of Virology. In: Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields in Virology*. Philadelphia, PA: Lippincott Williams and Wilkins. pp 25–57.
84. Wimmer E, Paul A (2010) The Picornaviruses. The making of a picornavirus genome. ASM Press. Washington, DC: E. Ehrenfeld, E. Domingo, R.R. Roos. pp 33–55.
85. Pariente N, Airaksinen A, Domingo E (2003) Mutagenesis versus inhibition in the efficiency of extinction of foot-and-mouth disease virus. *J Virol* 77: 7131–7138.
86. Popescu M, Schaefer H, Lehmann-Grube F (1976) Homologous interference of lymphocytic choriomeningitis virus: detection and measurement of interference focus-forming units. *J Virol* 20: 1–8.
87. Bruns M, Gessner A, Lothar H, Lehmann-Grube F (1988) Host cell-dependent homologous interference in lymphocytic choriomeningitis virus infection. *Virology* 166: 133–139.
88. Ellenberg P, Línero FN, Scolaro LA (2007) Superinfection exclusion in BHK-21 cells persistently infected with Junin virus. *J Gen Virol* 88: 2730–2739.
89. Ellenberg P, Edreira M, Scolaro L (2004) Resistance to superinfection of Vero cells persistently infected with Junin virus. *Arch Virol* 149: 507–522.
90. Tapia N, Fernandez G, Parera M, Gomez-Mariano G, Clotet B, et al. (2005) Combination of a mutagenic agent with a reverse transcriptase inhibitor results in systematic inhibition of HIV-1 infection. *Virology* 338: 1–8.
91. Meyer BJ, de la Torre JC, Southern PJ (2002) Arenaviruses: genomic RNAs transcription, and replication. In: Oldstone MBA, ed. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. Berlin: Springer. pp 139–157.
92. Mudd JA, Summers DF (1970) Polysomal ribonucleic acid of vesicular stomatitis virus-infected HeLa cells. *Virology* 42: 958–968.
93. Sobrino F, Dávila M, Ortín J, Domingo E (1983) Multiple genetic variants arise in the course of replication of foot-and-mouth disease virus in cell culture. *Virology* 128: 310–318.
94. Hall L, Rueckert RR (1971) Infection of mouse fibroblasts by cardioviruses: premature uncoating and its prevention by elevated pH and magnesium chloride. *Virology* 43: 152–165.
95. Domingo E, Dávila M, Ortín J (1980) Nucleotide sequence heterogeneity of the RNA from a natural population of foot-and-mouth-disease virus. *Gene* 11: 333–346.
96. de la Torre JC, Dávila M, Sobrino F, Ortín J, Domingo E (1985) Establishment of cell lines persistently infected with foot-and-mouth disease virus. *Virology* 145: 24–35.
97. Duke GM, Hoffman MA, Palmenberg AC (1992) Sequence and structural elements that contribute to efficient encephalomyocarditis virus RNA translation. *J Virol* 66: 1602–1609.
98. Rodriguez LL, Pauszek SJ, Bunch TA, Schumann KR (2002) Full-length genome analysis of natural isolates of vesicular stomatitis virus (Indiana 1 serotype) from North, Central and South America. *J Gen Virol* 83: 2475–2483.
99. Escarmis C, Dávila M, Charpentier N, Bracho A, Moya A, et al. (1996) Genetic lesions associated with Muller's ratchet in an RNA virus. *J Mol Biol* 264: 255–267.
100. Volkenstein MV (1994) Physical approaches to biological evolution. Berlin: Springer-Verlag.